

Série A

N° DE SÉRIE : 1303

N° D'ORDRE : 2172

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ
DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

ROBERT DAVID

Licencié ès sciences naturelles.

Pharmacien des Hôpitaux de Paris.

Assistant à la Faculté de Pharmacie.

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE NUMÉRIQUE DE LA MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE LIQUIDES. — INFLUENCE DE LA TENUEUR DES MILIEUX EN CERTAINS ÉLÉMENTS NUTRITIFS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1931 devant la Commission d'examen.

21 MAI 1931

MM. P. PORTIER

A. GUILLIERMOND,

M. JAVILLIER,

Président,

Examineurs.

CHARTRES
IMPRIMERIE DURAND

9, RUE FULBERT

1931

Série A

N° DE SÉRIE : 1303

N° D'ORDRE : 2172

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ
DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

ROBERT DAVID

Licencié ès sciences naturelles.

Pharmacien des Hôpitaux de Paris.

Assistant à la Faculté de Pharmacie.

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE NUMÉRIQUE DE LA MULTI-
PLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS DIFFÉRENTS
MILIEUX DE CULTURE LIQUIDES. — INFLUENCE DE LA
TENEUR DES MILIEUX EN CERTAINS ÉLÉMENTS NUTRITIFS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1931 devant la Commission d'examen.

MM. P. PORTIER

A. GUILLIERMOND,

M. JAVILLIER,

Président,

Examineurs.



CHARTRES
IMPRIMERIE DURAND

9, RUE FULBERT

1931

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen. C. MAURAIN, Professeur. Physique du globe.

Doyen honoraire. . . . M. MOLLIARD.

Professeurs honoraires. . . . {
 A. JOANNIS.
 H. LE CHATELIER.
 H. LEBESGUE.
 A. FERNBACH.
 A. LEDUC.
 E. HÉROUARD.

	ÉMILE PICARD.	Analyse supérieure et algèbre supérieure
	G. KOENIGS.	Mécanique physique et expérimentale.
	E. GOURSAT.	Calcul différentiel et calcul intégral.
	P. JANET.	Électrotechnique générale.
	F. WALLERANT.	Minéralogie.
	P. PAINLEVÉ.	Mécanique analytique et mécan. céleste.
	GABRIEL BERTRAND.	Chimie biologique.
	M ^{me} P. CURIE.	Physique générale et radioactivité.
	M. CAULLERY.	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
	G. URBAIN.	Chimie minérale.
	ÉMILE BOREL.	Calcul des probabilités et Physique math.
	L. MARCHIS.	Aviation.
	JEAN PERRIN.	Chimie physique.
	RÉMY PERRIER.	Zoologie (Enseignement P. C. N.).
	H. ABRAHAM.	Physique.
	M. MOLLIARD.	Physiologie végétale.
	E. CARTAN.	Géométrie supérieure.
	L. LAPICQUE.	Physiologie générale.
	E. VESSIOT.	Théorie des fonctions et théorie des transformations.
	A. COTTON.	Physique générale.
	J. DRACH.	Application de l'analyse à la géométrie.
	CHARLES FABRY.	Physique.
	CHARLES PÉREZ.	Zoologie.
	LÉON BERTRAND.	Géologie structurale et géol. appliquée.
	R. LESPIEAU.	Théories chimiques.
	E. RABAUD.	Biologie expérimentale.
	P. PORTIER.	Physiologie comparée.
	E. BLAISE.	Chimie organique.
	P.-A. DANGEARD.	Botanique.
	PAUL MONTEL.	Mécanique rationnelle.
	P. WINTREBERT.	Anatomie et histologie comparées.
	O. DUBOSCQ.	Biologie maritime.
	G. JULIA.	Mathématiques générales.
	A. MAILHE.	Étude des combustibles.
	L. LUTAUD.	Géographie phys. et géol. dynamique.
	EUGÈNE BLOCH.	Physique théorique et physique céleste.
	HENRI VILLAT.	Mécanique des fluides et applications.
	CH. JACOB.	Géologie.
	P. PASCAL.	Chimie minérale.
	LÉON BRILLOUIN.	Théories physiques.
	V. AUGER.	Chimie appliquée.
	E. ESCLANGON.	Astronomie.
	H. BENARD.	Physique (P. C. N.).
	C. MAUGUIN.	Minéralogie.
	L. BLARINGHEM.	Botanique.

Professeurs. . . .

E. PÉCHARD.	Chimie (Enseignement P. C. N.).	F. PICARD.	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
M. GUICHARD.	Chimie minérale.	ROBERT-LÉVY.	Zoologie.
A. GUILLET.	Physique.	L. DUNOYER.	Optique appliquée.
A. MICHEL-LÉVY.	Pétrographie.	A. GUILLIERMOND.	Botanique (P. C. N.).
A. DEREIMS.	Géologie.	A. DEBIERNE.	Radioactivité.
A. DENJOY.	Calcul différentiel et intégral.	M. FRÉCHET.	Calcul des Probabilités et Physiques mathématiques.
E. DARMOIS.	Physique.	M ^{me} RAMART-LUCAS.	Chimie organique.
G. BRUHAT.	Physique.	PAUTHENIER.	Mécanique des fluides.
H. MOUTON.	Chimie physique.	BÉGHIN.	Mécanique des fluides.
L. JOLEAUD.	Paléontologie.	FOCH.	Mécanique des fluides.
M. JAVILLIER.	Chimie biologique.		
A. DUFOUR.	Physique (P. C. N.)		

Secrétaire. A. PACAUD.

A MA FEMME
ET A MA FILLE

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RADAIS
Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris,
Membre de l'Académie de Médecine.

*Hommage de respectueuse reconnaissance.
Témoignage de profond dévouement.*

A MONSIEUR JEAN RÉGNIER

Professeur agrégé à la Faculté de Pharmacie,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris.

*Témoignage de sincère attachement
et d'affectueuse reconnaissance.*

INTRODUCTION

Les premiers bactériologistes, et parmi eux PASTEUR et KOCH, s'efforcèrent d'évaluer le nombre des bactéries présentes dans divers milieux naturels. Ils cherchèrent à connaître, de façon aussi exacte que possible, le taux des microbes contenus dans la terre et dans l'air, le degré de pollution des eaux ou le degré de souillure des matières nutritives. Ils créèrent ainsi des méthodes de numération des bactéries qui sont encore aujourd'hui classiques. Plus tard, d'autres chercheurs, poussés par la nécessité de n'employer en vaccinothérapie que des suspensions microbiennes titrées, mirent au point de nouvelles techniques.

Pourtant, malgré l'ampleur de ces travaux et la connaissance qu'en possède tout bactériologiste, on peut dire que les numérations des bactéries sont loin d'être entrées dans les habitudes des laboratoires. Le plus souvent on se contente d'estimations fort imprécises : « gouttes » ou « anses » s'il s'agit d'évaluer la grandeur d'un ensemencement, signes + en nombre plus ou moins grand s'il s'agit d'estimer l'importance de la multiplication microbienne.

C'est là une véritable lacune qui affaiblit la portée de la plupart des travaux ainsi effectués. En effet, pour nous en tenir aux simples essais de substances antiseptiques ou aux recherches relatives aux milieux chimiquement définis, il apparaît qu'il est indispensable d'exprimer, aussi exactement que possible, le nombre des germes mis en expérience ou le nombre des germes récoltés. Définir à un milligramme près, et souvent avec une approximation plus grande, le poids de la substance antiseptique mise en jeu et laisser dans une imprécision totale le nombre des microbes sur lesquels elle aura à agir, c'est laisser volontairement dans l'ombre l'un des facteurs principaux de la réaction. Tenir un compte exact des matières nutritives introduites dans un milieu parfaitement défini, et ne pas exprimer avec le même scrupule la valeur de la récolte qui en résulte, c'est presque renoncer à saisir exactement les phénomènes relatifs à la biologie microbienne. Il est bien évident que si RAULIN, et à sa suite d'autres expérimentateurs, n'avaient pas pesé, avec la même précision, aussi bien la récolte en mycélium d'*Aspergillus niger* que les substances

nutritives mises en œuvre, ils n'auraient jamais réussi à mettre au point, de façon si nette, leur milieu synthétique.

Nous pensons donc qu'il est absolument nécessaire d'introduire dans les travaux bactériologiques la notion de la quantité de microbes mis en expérience. Dans la plupart des cas, cette quantité sera exprimée par le nombre même des germes bactériens.

Mais, avant d'étudier et de traduire par des chiffres le développement microbien dans des milieux synthétiques divers, ou de chercher à connaître l'influence qu'exercent sur la division cellulaire des agents défavorables comme les antiseptiques ou des facteurs favorables comme tel ou tel élément chimique, *il était nécessaire de suivre simplement une multiplication microbienne dans des milieux usuels et dans les conditions habituelles*. Nous nous rendrons compte ainsi du rythme normal de la multiplication, du nombre total des germes produits et des différentes périodes de l'évolution bactérienne.

Depuis plusieurs années, au laboratoire de M. le Professeur RADAIS, J. RÉGNIER poursuit l'étude quantitative du développement microbien. L'influence de la nature de l'ensemencement (qualités et quantités des germes ensemencés) a été examinée dans différents travaux. Pour nous, en partant toujours d'ensemencements aussi identiques que possible, *nous avons étudié l'influence de la composition du milieu de culture sur l'évolution de la multiplication bactérienne*. Après avoir comparé, simplement au point de vue bactériologique (nombre de germes produits, rapidité de la division cellulaire), les résultats ainsi obtenus, nous chercherons à voir si les différences observées peuvent être facilement expliquées par des variations de la composition chimique des milieux employés.

Dans ce premier travail, qui pour une question si complexe ne peut être que préliminaire, nous étudierons, en fonction de la teneur en matières nutritives (et principalement de la teneur en éléments simples C, Az, S, P, Cl), la multiplication du bacille pyocyanique dans divers milieux de culture liquides. Au point de vue pratique nous chercherons si les milieux nutritifs de préparation complexe présentent, tout au moins pour le cas du bacille pyocyanique, un avantage réel sur les milieux de préparation plus simple. Enfin, au point de vue théorique, nous pénétrerons, par une voie jusqu'à présent peu fréquentée, dans le domaine si important de la nutrition bactérienne et dans l'étude des causes qui gouvernent les phénomènes de multiplication.

Dans le *premier chapitre* nous passerons en revue les méthodes qui ont été proposées pour dénombrer les microbes contenus dans un milieu liquide. Après avoir exposé les techniques nombreuses mises au point par les différents auteurs et en avoir montré, autant qu'il est possible, les avantages et les inconvénients, nous décrirons en détail les méthodes dont nous nous sommes servis pour effectuer nos propres essais. L'une de ces techniques est basée sur le principe classique de la numération des colonies qui se développent sur milieux solidifiés à la gélose, après ensemencement

de quantités connues de suspension bactérienne. L'autre consiste en une numération comparée, au microscope, de l'émulsion microbienne à l'étude et d'une émulsion de levures de titre connu. La première de ces méthodes, utilisée par presque tous les auteurs étrangers, nous renseigne sur le nombre des microbes capables de se reproduire sur un milieu solide différent de leur liquide originel. La seconde nous indique le nombre des microbes visibles. Ceux-ci comprennent les microbes capables de se multiplier sur milieu gélosé, les microbes qui ne peuvent se reproduire que dans le milieu liquide dans lequel ils ont pris naissance, et enfin les microbes morts, qui restent en suspension dans le liquide avant de disparaître par autolyse. La comparaison des chiffres donnés par ces deux méthodes, dans l'étude complète d'une multiplication bactérienne, apportera des résultats nouveaux, quelquefois fort intéressants.

Dans le *second chapitre* nous passerons en revue les principaux travaux, effectués par les auteurs étrangers, à propos du croît microbien. Nous indiquerons comment, d'après ces auteurs, on peut comprendre l'évolution bactérienne et la décomposer en phases diverses. Nous envisagerons les hypothèses émises pour essayer d'expliquer des points particuliers tels que la phase de latence ou le ralentissement de la multiplication. Nous montrerons enfin quelles sont les lacunes que présentent ces travaux, effectués uniquement à l'aide de la méthode de numération des colonies, et quelles nouvelles recherches peuvent être suggérées.

Dans le *troisième chapitre*, après avoir donné la formule de préparation des milieux liquides employés (milieux ordinaires, d'utilisation courante, et milieux synthétiques les plus connus), nous exposerons les résultats trouvés dans nos études de la multiplication microbienne faites à l'aide des deux méthodes de numération précédemment exposées. Nous montrerons les différences qui se produisent dans la poussée du microbe suivant les différents milieux et, à notre tour, nous mettrons en évidence des phénomènes peu connus ou même tout à fait nouveaux.

Enfin, dans le *quatrième chapitre*, nous décrirons les méthodes physiques ou chimiques choisies pour estimer la valeur nutritive des milieux étudiés. Après avoir examiné l'influence de la stérilisation à l'autoclave ou de la filtration sur bougie sur la constitution des liquides nutritifs, nous chercherons quelles sont les modifications apportées par le développement bactérien à la composition des milieux de culture. Nous comparerons pour cela la composition du liquide stérile à celle de la culture filtrée au moment où la multiplication s'arrête c'est-à-dire vers la 48^e heure. De l'ensemble de ces résultats, qui portent sur l'azote sous différentes formes, le carbone, le phosphore, le soufre et le chlore, le pH, la tension superficielle et le pouvoir rotatoire, et de leur comparaison avec le nombre des microbes obtenus et avec la valeur de certaines phases typiques du processus de multiplication, nous tirerons des conclusions de portée générale ou particulière, d'intérêt théorique ou d'intérêt pratique.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie. Nous sommes particulièrement heureux de pouvoir remercier ici M. le Professeur RADAIS qui, en nous accueillant comme Moniteur aux Travaux pratiques de Bactériologie, nous a permis de nous intéresser à ce genre de recherches, et qui depuis, par ses conseils et ses encouragements, n'a cessé de faciliter notre tâche.

Nous sommes également heureux de remercier M. DEVAL, Chef de travaux à la Faculté de Pharmacie, pour la bienveillance qu'il a toujours montrée à notre égard.

Depuis bientôt dix ans, M. J. RÉGNIER, Professeur agrégé, Pharmacien des hôpitaux, s'est toujours intéressé à nous. Pendant cette longue période, dans les bons comme dans les mauvais jours, il n'a pas cessé de nous diriger et de nous apporter l'aide de son expérience, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

CHAPITRE I

TECHNIQUES UTILISÉES POUR L'ÉTUDE QUANTITATIVE DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE

Les différentes techniques utilisées pour évaluer le nombre des microbes présents dans un volume déterminé de liquide peuvent se diviser en plusieurs groupes : procédés physiques, procédés bactériologiques et procédés chimiques.

Les mesures physiques donnent, d'une façon indirecte, le nombre cherché. Du volume ou du poids d'une masse microbienne isolée par centrifugation, de l'appréciation du degré d'opacité d'une émulsion bactérienne ou de l'évaluation de la quantité de colorant absorbée par cette même suspension, on pourra déduire le nombre des microbes présents dans la prise d'essai.

Les techniques bactériologiques, au contraire, donnent directement le nombre des bactéries. Deux méthodes, très différentes, permettent de procéder à cette numération. D'une part on peut compter tous les microbes visibles présents dans un petit volume du liquide examiné ; d'autre part on peut, au moyen d'ensemencements sur milieux nutritifs, déterminer le nombre des germes vivants existants dans ce même liquide ¹.

Enfin les méthodes chimiques, en nous renseignant sur la formation ou la disparition au sein d'un milieu de culture, d'un principe bien défini, nous donnent des indications sur l'évolution d'une multiplication microbienne.

Il est évident que des techniques aussi diverses ne fournissent pas toujours des résultats concordants. Dès maintenant nous devons faire ressortir que certaines méthodes (mesure du volume ou pesée des corps microbiens, opacimétrie, numération des bactéries visibles) donnent la

1. Sous le nom de microbes « vivants » nous désignerons les microbes capables de se reproduire. La fonction de reproduction paraît être, en effet, *a priori*, et tout au moins pour les bactéries, le principal test de la vie. Il n'en est pas moins vrai, comme nous le verrons plus tard, que nous serons amenés à mieux définir ce que nous entendons par fonction de reproduction.

totalité des germes (microbes vivants et microbes morts), tandis que d'autres méthodes (ensemencements sur milieux nutritifs) donnent seulement le nombre des microbes capables de se multiplier.

Nous allons passer en revue les principaux procédés utilisés, puis nous exposerons les techniques que nous avons choisies pour effectuer nos propres essais.

I. — MÉTHODES DONNANT LE NOMBRE TOTAL DES MICROBES (" MORTS " ET " VIVANTS ") PRÉSENTS DANS LA CULTURE

A. — Détermination indirecte du nombre des microbes par volumétrie, pesée, opacimétrie et colorimétrie.

1° MESURE DU VOLUME DE LA MASSE MICROBIENNE. — Par centrifugation on sépare les organismes du milieu de culture et on les collecte dans des tubes spécialement gradués. Si, au moyen d'une méthode de numération directe, on a déterminé auparavant le nombre des microorganismes présents dans une unité de volume, il est facile de traduire le volume, lu après centrifugation, en nombre de cellules. Cette méthode a été utilisée par PAINE (150) en 1911, puis par CARLSON (35) en 1913. SLATOR (180) l'a employée en 1921 pour l'étude des levures. Pour obtenir le volume microbien minimum il est indispensable d'avoir recours à une centrifugeuse tournant à grande vitesse (au moins 7 000 tours à la minute), et de centrifuger pendant au moins 15 minutes.

2° EVALUATION DU POIDS DE LA MASSE MICROBIENNE. — Cette méthode est dans son principe très voisine de la précédente. Il suffit de substituer à la mesure du volume obtenu après centrifugation l'évaluation du poids du culot microbien. Pour le titrage des vaccins à staphylocoques SABOURAUD (167) sépare les cocci par une première centrifugation. Il les remet en suspension dans du sérum physiologique puis centrifuge une seconde fois. Il se contente alors d'enlever à la pipette toute l'eau qu'il est possible d'aspirer et pèse le résidu. L'expérience montre, dit-il, que le culot contient sensiblement 500 millions de cocci par milligramme.

Cette technique, peut-être suffisante quand il s'agit de titrer des vaccins, n'est pas très précise.

Il est préférable d'effectuer plusieurs lavages à l'eau distillée, pour éliminer les substances adsorbées, et de dessécher à poids constant le culot microbien. F. VLÈS (188), dans des expériences instituées pour contrôler les recherches opacimétriques dont nous parlerons tout à l'heure, utilise le mode opératoire suivant. L'émulsion (provenant d'une culture sur gélose) est centrifugée à 6 ou 7 000 tours pendant 10 minutes, par portions de 40 centimètres cubes environ. Le liquide, assez fortement coloré en jaune et légèrement opalescent, est décanté. Chaque culot bactérien

est alors remis en suspension dans 40 centimètres cubes d'eau distillée et soumis à nouveau à la centrifugation pendant 10 minutes. Le liquide surnageant, incolore et presque complètement limpide, est rejeté et le culot bactérien est desséché à poids constant à l'étuve à 110° dans le tube même. Du poids final (tube + culot sec) taré en bloc, on retranche le poids du tube nettoyé et redesséché.

3° EVALUATION DU TROUBLE APPORTÉ AUX MILIEUX LIQUIDES PAR LA MASSE MICROBIENNE. — Il est d'un usage courant dans les laboratoires de bactériologie d'estimer superficiellement la richesse d'une culture bactérienne, ou la concentration d'une émulsion microbienne, en appréciant grossièrement l'opacité du liquide examiné, opacité produite par les corps bactériens en suspension dans le liquide. Il était donc naturel de chercher à perfectionner ce procédé et à essayer de déduire de la valeur du trouble produit, le nombre des microbes présents dans l'unité de volume. De nombreux auteurs travaillèrent dans ce sens. Dès 1902 BOLAND (24), pour étudier la multiplication microbienne, compare le trouble des cultures à une opacité standard. Dans le même but DAVISON (50), en 1916, apprécie, à travers les tubes d'émulsion, la visibilité d'une grille.

En 1919, HARVEY (94) proposa son « tinturomètre » simple éprouvette pleine d'émulsion bactérienne, dans le fond de laquelle était placée une marque visible. Il suffisait, pour avoir idée de la concentration en bactéries, de diluer ou de concentrer l'émulsion jusqu'à ce qu'on atteigne la limite de visibilité de la marque. Enfin GATES (80), en 1920, simplifie encore ce procédé. Il se contente d'augmenter ou de diminuer la densité de la suspension microbienne jusqu'à ce qu'une anse de platine, plongée dans le liquide, cesse d'être visible.

À côté de ces procédés, qui ne sont guère que des « tours de mains » de laboratoire, nous en trouvons d'autres beaucoup plus intéressants.

En 1916 DREYER, DUNCAN et GARDNER (54), pour étudier les phénomènes d'agglutination, utilisèrent la technique suivante. Ils plaçaient dans une série de petits tubes à essais une suspension microbienne et des dilutions progressives de cette même suspension. Les tubes, maintenus sur fond sombre, étaient alors soumis à un éclairage artificiel et les auteurs comparaient les troubles produits à celui d'un tube témoin. Connaissant les dilutions effectuées et la teneur en microbes du tube étalon, il était facile d'évaluer la quantité de microbes contenus dans l'émulsion envisagée.

En 1918, DERNBY et AVERY (51), après avoir employé la méthode des plaques de gélose, estimèrent qu'il était préférable d'effectuer des numérations bactériennes indirectes en employant le néphélomètre de KOBER (117). Ils cherchèrent, sans succès, à utiliser comme standards des suspensions titrées de chlorure d'argent et prirent finalement comme étalon des suspensions titrées de pneumocoques morts. Ces auteurs tinrent compte des différences de teintes provoquées par les bouillons de culture

et établirent expérimentalement les courbes nécessaires à ces calculs. Un an plus tard, AVERY, GLEN et CULLEN (7) eurent recours à la méthode néphélométrique pour rechercher la concentration en ions H la plus favorable à la multiplication du pneumocoque en présence d'hydrates de carbone.

D'autres essais furent faits à la même époque, 1917, par des auteurs italiens : PORCELLI-TITONE (153) et GOSIO (85). Ce dernier utilisait un « vaccinoscope » analogue au « tube de Baly » des spectroscopistes en lumière blanche, tube plongeur que l'on déplaçait jusqu'à la limite de visibilité d'un signe.

En 1921 LÉOPOLD ROBERT (164) présente un diaphanomètre spécial pour le titrage des émulsions microbiennes. Le principe de la mesure était le suivant. On faisait, à l'aide des cultures, une suspension microbienne suffisamment riche de volume connu. Une quantité déterminée de cette émulsion était introduite dans un tube A, gradué en quarts de centimètre cube, et on comparait l'opacité donnée par ce tube A à celle que présentait un tube B, exactement semblable, et contenant la suspension microbienne étalon. Il suffirait ensuite d'amener à égalité les opalescences des tubes A et B en additionnant progressivement le tube A d'eau salée ou fluorée. De la proportion d'eau ajoutée à l'émulsion contenue dans le tube A, on déduisait la quantité qu'il fallait ajouter à l'émulsion totale pour obtenir le titre cherché.

La même année, un auteur danois, HANS HECKSCHER (96) proposa une technique néphélométrique pour le titrage des émulsions bactériennes. Il ne se borna pas à amener le vaccin à un certain taux de bactéries, mais, par comparaison avec de nombreux tubes d'émulsions microbiennes formolées servant d'étalons, et dont les teneurs ne différaient les unes des autres que de 10 en 10 pour 100, il chercha à connaître le taux exact de l'émulsion qu'il étudiait. Il décrivit en détails l'appareil utilisé, montra de quelle façon on pouvait obtenir la *valeur néphélométrique* cherchée et calcula l'erreur moyenne qui, d'après lui, ne dépassait pas 5 pour 100.

C'est incontestablement à un auteur français FRED VLÈS (188) que l'on doit l'étude la plus approfondie et la plus scientifique de cette méthode. VLÈS, attaché pendant la guerre au laboratoire du Val-de-Grâce où H. VINCENT préparait son vaccin antityphique, s'appliqua à mettre au point un appareil opacimétrique capable de doser rapidement et avec précision la teneur en « substance bactérienne » du vaccin. Il montra tout d'abord que toutes les recherches précédentes, aussi bien néphélométriques qu'opacimétriques¹, étaient passibles d'une critique importante car tous ces essais avaient été faits en lumière blanche. Or, d'après lui, des phénomènes d'absorption moléculaire inévitables « étouffent sur place une part des radiations incidentes », et cet « étouffement » varie avec les

1. Dans les mesures opacimétriques on mesure la perte de lumière subie par un faisceau lumineux traversant le milieu trouble. Dans les mesures néphélométriques on mesure le faisceau latéral diffracté sur le côté et qui est, théoriquement, complémentaire du premier.

diverses radiations. Il faudra donc utiliser une radiation monochromatique. VLÈS étudia ensuite, avec un soin extrême, l'origine des pertes que fait subir à un faisceau lumineux une émulsion bactérienne. Il montra que l'opacité totale de cette émulsion, loin d'être simple, englobe les phénomènes suivants :

- 1° absorption par le corps de la bactérie ;
- 2° absorption par le liquide interbacillaire ;
- 3° phénomènes divers de réfraction, dispersion, diffraction sur la limite de séparation de ces deux éléments ;
- 4° diffraction et diffusion par des éléments colloïdaux contenus dans le liquide interbacillaire.

Constatant alors que seuls les phénomènes cités en 1° et 3° sont liés à la quantité des bactéries, et que la principale cause d'erreur est celle qui est envisagée en 2°, il chercha à opérer sur un groupe de radiations lumineuses qui ne coïncident pas avec les bandes d'absorption du spectre du liquide interbacillaire, liquide presque toujours coloré. Par un ensemble de recherches spectrophotométriques portant sur divers milieux de culture usuels et sur différentes émulsions bactériennes, VLÈS montra qu'il fallait, pour les mesures d'opacimétrie microbienne, se cantonner pour le faisceau lumineux vers la région des longueurs d'onde de 600 à 650 μ , de l'extrémité rouge du spectre. Il construisit deux appareils, d'abord un « opacimètre à polarisation » puis, en 1917, un « opacimètre à écran progressif » qui furent gradués expérimentalement, après numérations microscopiques directes, en nombre de bacilles typhiques par centimètre cube

Non seulement F. VLÈS résolut pratiquement le problème de la mesure de l'opacité microbienne, mais ce fut pour lui l'occasion d'effectuer toute une série de recherches théoriques du plus haut intérêt. Nous ne pouvons citer ici que ses conclusions. Les émulsions bactériennes n'agissent pas fondamentalement sur les rayons lumineux par *absorption*, c'est-à-dire à la manière d'une solution de matière colorante. En effet, les valeurs numériques trouvées ne répondent pas aux lois exponentielles (Loi de BEER-LAMBERT) qui régiraient un tel phénomène. Elles n'agissent pas davantage comme des *systèmes diffracteurs parfaits* obéissant à la loi classique de LORD RAYLEIGH (milieux troubles formés de particules petites par rapport à la longueur d'onde). Le phénomène de l'opacité bactérienne est donc complexe et pose le problème des lois de la transmission de milieux troubles dont les éléments ne sont pas plus petits que la longueur d'onde.

Par l'examen de suspensions de bactéries, d'hématies, de spores, etc... VLÈS put préciser, en première approximation, des lois empiriques de la transmission de milieux troubles à gros éléments. Il montra que ces lois sont résumées par trois formules pratiquement à peu près équivalentes, l'une hyperbolique, les deux autres exponentielles, qui relient la transmission optique au nombre et aux dimensions (volumes ou poids secs)

des particules ; l'une de ces formules peut être reliée à une extrapolation de la loi de LORD RAYLEIGH. La variable fondamentale qui intervient dans ce phénomène est la *quantité de substance* répartie dans l'émulsion. On voit donc à quel degré de précision cet auteur a poussé ses recherches.

4° ÉVALUATION DE LA QUANTITÉ DE COLORANT ABSORBÉE PAR LA MASSE MICROBIENNE. — ZELIKOW (198), en 1906, a proposé d'estimer le nombre de bactéries contenues dans une suspension en mesurant la quantité de colorant (fuchsine) absorbée par ces organismes. La concentration du colorant était déterminée avant et après absorption au moyen d'un colorimètre de DUBOSQ. Il nous semble difficile d'admettre que cette technique puisse donner des résultats exacts. La quantité de colorant fixée par les microbes dépend avant tout des phénomènes d'adsorption, qui sont fort complexes, et qui varient notamment avec la nature du milieu où se trouvent les bactéries et avec l'état de celles-ci (vitalité, âge, etc...).

Critique de ces différentes méthodes. — Toutes les techniques que nous venons de passer en revue sont passibles de critiques importantes.

La centrifugation, lorsqu'on l'utilise, peut produire une erreur par défaut qu'on peut attribuer à deux causes principales :

a) les lavages répétés à l'eau distillée peuvent provoquer la bactériolyse, et par suite l'élimination, d'un petit nombre d'éléments microbiens. Cette lyse doit d'ailleurs être assez faible en raison de la courte durée de l'opération (10 à 15 minutes) ;

b) il est possible qu'une centrifugation, même bien faite, laisse subsister dans le liquide surnageant des éléments bactériens de texture légèrement modifiée. Les bactéries peuvent en effet dans certaines circonstances, et en particulier lorsqu'on les plonge dans l'eau distillée, se charger d'eau, leur densité se trouve de ce fait diminuée et leur séparation, par centrifugation, est rendue beaucoup plus difficile. Cette cause d'erreur doit être la plus importante.

Quoi qu'il en soit, d'après F. VLÈS qui a étudié spécialement cette question, l'erreur par défaut provenant des lavages par centrifugation faits dans l'eau distillée peut atteindre 25 pour 100, chiffre considérable.

Pour atténuer ces échanges osmotiques, il serait peut-être préférable de remplacer les lavages à l'eau distillée par des lavages avec de l'eau salée physiologique. Le chlorure de sodium, qui de ce fait resterait fixé au culot microbien, n'apporterait pas une erreur importante¹. Nous devons pourtant convenir que nous ne savons nullement si l'eau salée physiologique, dont le titre a été établi en tenant compte de la résistance osmo-

1. F. VLÈS a calculé l'ordre de grandeur de la proportion de chlorure de sodium qui resterait après centrifugation à partir d'une émulsion bactérienne en eau salée physiologique. Pour 40 centimètres cubes d'émulsion initiale que la centrifugation ramène à un culot d'environ 1 centimètre cube, il resterait fixé à celui-ci au plus 0^{gr},004 de chlorure de sodium. Comme le poids du culot bactérien sec est de 0^{gr},3 à 0^{gr},4, on voit que l'erreur par excès est inférieure à 1 pour 100, c'est-à-dire pratiquement négligeable.

tique des hématies, convient au même degré à la conservation des bactéries. Il semble même, d'après les travaux de A. DUTHOIT (57) et de différents auteurs, qu'après un temps de contact assez prolongé les microbes sont détruits, non seulement par l'eau distillée, mais encore par l'eau salée physiologique.

D'une façon beaucoup plus générale toutes ces méthodes, en cherchant à évaluer la masse totale d'une culture microbienne, se heurtent à certaines difficultés qui nuisent, dans une proportion inconnue, à l'exactitude des résultats. Que ce soit par mesure du volume, appréciation du poids, ou évaluation de l'opacité bactérienne, on n'isole jamais une masse microbienne parfaitement pure.

a) il y a toujours, adsorbée par le microbe, une certaine quantité de substances salines ou colloïdales dont il est très difficile de se débarrasser ;

b) il semble évident que, dans certaines circonstances, le volume, le poids et les propriétés optiques des bactéries varient avec l'état d'hydratation de celles-ci. On constate par exemple que, sous l'influence de causes encore inconnues, le pourtour visqueux de certains microbes capsulés est plus ou moins important ;

c) enfin ces méthodes, qui peuvent être utilisées avec fruit quand il s'agit de titrer des vaccins préparés en émulsionnant des cultures sur gélose, conviennent beaucoup moins pour le but que nous poursuivons. Pour nous qui voulons suivre, pendant de nombreux jours, la multiplication microbienne dans un milieu de culture liquide, nos mesures seront fatalement gênées, puis définitivement arrêtées, par les troubles et les précipités d'ordre chimique ou physique qui prendront naissance, dans le milieu même, sous l'influence de l'activité bio-chimique de la bactérie. Certains, parmi les auteurs qui ont utilisé ces méthodes pour étudier l'évolution d'une culture microbienne, se sont heurtés à ces difficultés et ont été obligés de limiter les conditions de leurs mesures. C'est ainsi que DERNBY et AVERY (51), dans leurs recherches sur le pneumocoque, constatent qu'il faut limiter l'emploi du néphélémètre aux milieux liquides de pH compris entre 6 et 8.

B. — Numération microscopique de la totalité des éléments microbiens.

Il est possible de compter un par un, au microscope, les bacilles morts et vivants qui se trouvent dans une petite fraction d'un liquide donné. Cette numération, pénible mais relativement exacte, peut être conduite de trois façons différentes.

1° On peut étaler sur une petite surface bien déterminée une très petite fraction, exactement mesurée, du liquide à examiner. Après fixation et coloration on compte la totalité des microbes apportés sur cette surface et on obtient ainsi le nombre total des germes existants dans la petite prise d'essai.

Nous désignerons ce mode opératoire sous le nom de numération microscopique directe.

2° Un autre procédé consiste à dénombrer les microbes contenus dans un volume très petit, mais exactement connu, d'une suspension bactérienne, en employant pour cela une chambre à numération analogue à celle qu'on utilise pour la détermination du nombre des globules du sang. C'est la numération des bactéries au moyen du compte-microbes.

3° On peut mélanger, en proportions connues, l'émulsion bactérienne à titrer avec une émulsion d'éléments figurés assez gros (hématies ou cellules de levure), dont on a préalablement évalué le titre au moyen d'un hématimètre. Après étalement et coloration du mélange, on détermine la *fréquence relative* des bactéries et des éléments figurés. Par un calcul fort simple on en déduit le titre en bactéries de l'émulsion microbienne. Nous avons donc affaire, dans ce cas, à une numération microscopique comparative. Nous allons passer en revue ces différentes techniques.

1° EVALUATION DU NOMBRE DES MICROBES PAR NUMÉRATION MICROSCOPIQUE DIRECTE. — KLEIN (115), en 1900, fut le premier à mettre au point ce procédé. Ayant remarqué que les spores des bactéries étaient beaucoup plus sensibles à l'action des désinfectants lorsqu'on agissait en milieu humide que lorsqu'on se trouvait en milieu sec, il pensa que les organismes inférieurs devaient également fixer les matières colorantes beaucoup plus facilement en milieu humide. Les expériences qu'il fit confirmèrent cette hypothèse et, contrairement à KOCH qui desséchait puis fixait ses préparations avant de les colorer, il fit agir le colorant sur les bactéries humides et attendit, pour les dessécher et les fixer, que ces organismes soient bien colorés. Il constata qu'en opérant de cette façon, il suffisait de deux minutes de contact pour colorer fortement les microbes ordinaires et pour commencer à teinter les formes plus résistantes comme le bacille tuberculeux ou les spores. Par contre les organismes traités par cette méthode étaient faciles à décolorer et, pour les inclusions au baume du Canada ou au xylol que KLEIN réalisait après la coloration, il fallait éviter la légère réaction acide de ces produits. Pour procéder à la numération des bactéries, KLEIN opère de la façon suivante. Dans un verre de montre on place une petite quantité ($0^{\text{cm}^3},5$ par ex.) d'une culture liquide, ou d'une émulsion microbienne dans l'eau physiologique, avec une quantité égale d'une solution aqueuse anilinée de violet de gentiane. Les deux liquides sont mélangés à l'aide d'une anse de platine. Après 2 à 3 minutes de contact les bactéries sont déjà très intensément colorées. On prélève alors une partie connue du mélange à l'aide d'une *anse de platine jaugée* et on l'étales uniformément sur une lamelle. On laisse la préparation sécher à l'air, on la passe 2 ou 3 fois à la flamme et on l'inclut dans le xylol ou le baume du Canada. Les bactéries apparaissent au microscope fortement colorées. L'examen de la surface totale de la lamelle n'est pas nécessaire.

Il suffit d'effectuer la numération sur une cinquantaine de champs microscopiques et de prendre la moyenne des chiffres trouvés. Par un simple calcul, en considérant la capacité de l'anse de platine, la surface de la lamelle et la surface du champ microscopique, on obtient le nombre de bactéries contenues dans un centimètre cube de la suspension microbienne. D'après l'auteur ce procédé n'est applicable que pour une teneur assez grande en bactéries, de l'ordre de quelques millions par centimètre cube.

L'année suivante, en 1901, HEHEWERTH (98) étudie cette méthode et lui apporte quelques perfectionnements. Il conseille d'étaler le liquide assez rapidement en évitant d'atteindre la dessiccation ; il avait remarqué, en effet, qu'une dessiccation complète donne un chiffre nettement inférieur et il attribuait ce phénomène à une sorte de pulvérisation des microbes. Il montre également qu'il n'y a pas lieu de laver à l'eau la préparation entre sa fixation et son inclusion, les bactéries sont si électivement et si fortement colorées qu'il est très facile de les distinguer des précipités de colorant d'ailleurs très peu nombreux. Il donne enfin quelques indications numériques et recommande d'utiliser pour une lamelle quadrangulaire de 18 millimètres de côté une anse de platine de 1,5 à 2^{me},5 de capacité, et pour une lamelle ronde de 10 millimètres de diamètre une anse de 0,5 à 1 milligramme de capacité. Les numérations sont faites en employant un oculaire micrométrique 4 et un objectif à immersion au 1/12.

Quelques auteurs utilisèrent ensuite des techniques analogues.

Dans une culture microbienne la multiplication intensive s'arrête brusquement au bout de quelques jours. ELJKMAN (60), en 1904, recherche la cause de ce phénomène en évaluant, d'une part le nombre des bactéries « vivantes » au moyen du procédé des plaques de gélose, et d'autre part le nombre des germes visibles en utilisant la technique suivante. On étend en couche uniforme sur une lame, une quantité exactement mesurée d'une culture faite en bouillon gélatiné liquéfié. Après solidification on durcit la gélatine au formol, on la colore au bleu de méthylène, on la déshydrate à l'alcool et on l'inclut finalement dans le baume du Canada. Il ne reste plus qu'à effectuer la numération.

En 1915, THÖNI et THAYSEN (184) emploient cette même technique de numération après mélange à la gélatine mais, travaillant sur le bacille tuberculeux, ils effectuent leur coloration par la méthode de BÜRRI à l'encre de Chine.

En 1916, HUGO SELTER (171) recherchant, comme les auteurs précédents, le nombre de bacilles tuberculeux nécessaire pour donner la tuberculose au cobaye, utilise la méthode indiquée par MÜLLER pour la numération des germes de l'eau. Une petite quantité de la culture, poussée sur gélose ou en bouillon, était longuement broyée dans un mortier d'agate, puis émulsionnée dans une solution salée ajoutée goutte à goutte. L'émulsion diluée était laissée toute la nuit à la glacière. Le lendemain matin la

partie supérieure était prélevée et centrifugée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus, dans le liquide surnageant, que des bactéries isolées. Celui-ci était alors décanté et on procédait à sa numération. On utilisait pour cela une lame porte-objet sur laquelle on avait délimité une surface de 1 centimètre carré. Une anse de platine contenant un milligramme de l'émulsion était étalée sur la surface ainsi définie, on fixait et on colorait au Ziehl. La numération des bactéries était faite avec un objectif au $1/12$, un oculaire 2 et un champ microscopique de $1/2000$ de centimètre carré. Pour obtenir un nombre moyen, sensiblement exact, des bactéries par champ microscopique, il suffisait d'examiner 30 à 40 champs et de prendre la moyenne des chiffres trouvés.

Enfin, la même année, BREED et BREW (25) appliquèrent une méthode semblable à la numération des bactéries du lait. Ils effectuèrent la coloration après dessiccation, fixation et enlèvement des matières grasses.

En 1916 ALEX. KLEIN (116), pour le titrage des vaccins, reprit le procédé qu'il avait indiqué en 1900 en lui apportant quelques modifications dont certaines paraissent être inspirées des travaux cités plus haut. L'émulsion microbienne est placée pendant plusieurs heures dans un agitateur mécanique puis colorée avec du violet de méthyle pendant cinq minutes, d'abord à la température du laboratoire, puis au bain-marie à 37° . On y ajoute alors de la gélatine liquéfiée et on mélange le tout. Avec une anse de capacité connue on étale cette émulsion sur une lamelle ronde de 15 millimètres de diamètre, on dessèche la préparation sans flamber ni laver et on l'inclut dans du baume du Canada. On compte les microbes dans 100 champs microscopiques, on fait la moyenne et, en multipliant ce nombre moyen par une formule où figurent le rayon de la lamelle, le rayon du champ microscopique et la capacité de l'anse de platine, on a le nombre des microbes contenus dans 1 centimètre cube d'émulsion. D'après KLEIN cette technique fournit des résultats plus exacts que ceux qui sont donnés par les procédés de numération comparative tels que le procédé de WRIGHT.

En 1921, HANS HECKSCHER (95) présenta une technique de numération basée, comme les précédentes, sur les principes fixés par KLEIN et HEHEWERTH, puis ELLERMANN et ERLANDSEN (61). La suspension microbienne est diluée au demi dans une solution de chlorure de sodium et de formol (0,50 pour 100 de NaCl et 2 pour 100 de formol). On additionne cette émulsion d'une quantité connue de solution alcoolique de violet de méthyle aniliné et on chauffe à 65° . On prélève, avec une pipette compte-gouttes ou à graduation capillaire, une quantité définie du mélange et on dépose cette petite fraction à l'intérieur d'un cercle de 15 millimètres de diamètre tracé sur une lame porte-objet. On l'étale à l'aide d'un mince fil de platine et, après dessiccation à l'air, on compte les microbes contenus dans un certain nombre de champs. Il ne reste plus qu'à faire les calculs nécessaires. L'auteur donne un certain nombre de renseignements complémentaires. Il utilise un oculaire 3 et un objectif à immersion au

1/12 pour une longueur du tube d'environ 16 centimètres. Pour obtenir le nombre des microbes, il faut faire la numération dans 15 champs microscopiques situés sur un même diamètre et distants de 1 millimètre les uns des autres et dans 15 autres champs placés sur un diamètre perpendiculaire au premier. Enfin pour que la suspension microbienne adhère bien à la lame porte-objet, il faut faire subir à celle-ci les traitements suivants : séjour de 24 heures dans de l'eau savonneuse fortement alcaline, rinçage et essuyage ; séjour de plusieurs heures dans l'alcool absolu, lavage à l'éther et passage dans une flamme de gaz ; enfin éraillage de la surface avec une toile émeri à grains très fins, essuyage et flambage énergique avant l'utilisation.

Deux ans plus tard, en 1923, ARTHUR T. HENRICI (100) proposa un nouveau procédé qui lui permettait, non seulement de déterminer le nombre des cellules bactériennes contenues dans une suspension, mais encore d'en noter la taille et la forme et de distinguer les cellules qui prennent bien la matière colorante. Nous étudierons plus loin cette technique qui, d'après son auteur, permet de dénombrer les bactéries vivantes à l'exclusion des cellules mortes. Notons simplement ici que HENRICI conseille de préparer un assez grand nombre de lames et de choisir, pour la numération, celles où l'étalement est le plus régulier. En examinant au moins cinq lames, et en comptant sur chacune au moins 20 champs de $0{,}01\text{ mm}^2$, on obtient, d'après l'auteur, une erreur moyenne de 10 pour 100. HENRICI admet que, pour les petites bactéries, la numération par ce procédé est plus facile que par les méthodes qui utilisent les chambres de numération.

On voit donc que la méthode initiale de KLEIN a été considérablement améliorée par cet auteur ou par d'autres chercheurs. On doit cependant remarquer que presque tous ces procédés ont, à leur origine, une cause d'erreur qui peut être très importante. Toutes ces méthodes supposent que les anses de platine, qui servent à prélever une quantité déterminée de la suspension microbienne, sont très exactement jaugées et transportent toujours la même quantité d'émulsion microbienne. Or les capacités de ces anses sont si petites ($0{,}5$ à 2 mgr , 5 pour HEHEWERTH ; $0{,}01\text{ cm}^3$ ou moins pour d'autres auteurs), qu'une très faible erreur dans la mesure de ces grandeurs, erreur bien difficile à éviter, prend, par comparaison, une grande importance. D'autre part, pour que les numérations soient exactes, il faut que la totalité du liquide chargé de bactéries quitte l'anse de platine pour venir se fixer sur la lame ou la lamelle. Malgré tous les soins que l'on peut prendre, il est bien difficile d'admettre que l'« essuyage » sera toujours parfait. Enfin la quantité de suspension microbienne transportée par une même anse de platine ne sera pas toujours la même. Elle dépend, avant tout, des qualités physiques du liquide utilisé et la tension superficielle, sans parler de la viscosité, joue ici un rôle considérable. Or non seulement cette tension superficielle, toujours différente de celle de l'eau, varie avec les différents milieux de culture, mais, pour un même

milieu, elle varie également suivant l'évolution de la multiplication microbienne. Ce dernier fait, signalé par KOPACZEWSKI et retrouvé par nous, tient sans doute à l'apparition ou à la disparition progressive des peptones. Il nous paraît donc impossible d'utiliser les procédés mis au point par les auteurs précédents pour suivre la multiplication bactérienne dans un milieu de culture donné. Nous faisons toutefois remarquer qu'il n'en serait pas de même si nous nous bornions, comme ces auteurs, à titrer en nombre de germes par centimètre cube des vaccins microbiens.

Un nouveau mode opératoire, mis au point par HENRIQUES (104), est cependant capable d'améliorer, dans une large mesure, les méthodes de numération microscopique directe. Nous avons vu que certains auteurs (EIJKMAN, THÖNI et THAYSEN, KLEIN en 1916), avaient eu l'idée d'ajouter à la suspension microbienne, portée à 37°, une certaine quantité de gélatine liquéfiée. Cette addition était due, en grande partie, au désir qu'avaient ces auteurs d'obtenir une répartition homogène des bactéries. En effet, lorsqu'on laisse une petite quantité d'émulsion bactérienne se dessécher sur une lame, on constate que les bactéries sont plus nombreuses vers les bords de la gouttelette liquide. Ce phénomène, particulièrement gênant dans le cas qui nous occupe, est dû au fait que l'évaporation étant plus intense sur les bords de la petite masse liquide, il se produit des courants du centre vers la périphérie de celle-ci, d'où accumulation des micro-organismes vers les bords de la préparation. L'addition de gélatine entrave ces transports microbiens, mais elle a le désavantage d'exiger une température légèrement élevée et de rendre, par une solidification un peu trop rapide, l'étalement assez difficile. Pour éviter ces inconvénients, HENRIQUES, en 1923, propose de « stabiliser » la suspension microbienne à l'aide d'un « colloïde protecteur », par exemple par addition de 0,5 à 2 pour 100 de gomme arabique ou de 2 pour 100 de peptone, de la même façon que l'on stabilise en pharmacie une suspension de bismuth. Cette addition permet d'utiliser des pipettes graduées très fines, car le colloïde régularise l'aspiration et le rejet de la suspension microbienne, en empêchant la formation, dans la pipette, d'un courant central plus riche en bactéries. D'après l'auteur, il est donc possible d'opérer sur des masses microbiennes très petites, et pourtant mesurées exactement en volume, ce qui peut nous mettre à l'abri des causes d'erreur dont nous parlions tout à l'heure. A titre d'indication, nous rapportons ici la technique de HENRIQUES.

« Le procédé le plus commode (pour dénombrer les microbes contenus dans une suspension bactérienne), consiste à déposer une fraction (par exemple 0^{mm3},5) de la suspension de bactéries à colloïdes sur une petite étendue de la lame, et à compter toutes les bactéries contenues dans la goutte desséchée. La pipette capillaire la plus fine est divisée en dixièmes de millimètre cube, les traits de division étant espacés de 2^{mm},5 environ ; l'extrémité doit être effilée en pointe vers le tube capillaire dans une petite flamme, après quoi elle est coupée et bordée dans la flamme. La

pipette est divisée à l'aide de pesées de mercure. Pour éviter les erreurs provenant de la différence éventuelle de la viscosité et de l'adhérence des suspensions de bactéries à la paroi de la pipette, et obtenir ainsi constamment des volumes égaux, j'aspire d'abord deux millimètres cubes environ d'eau distillée dans la pipette et, immédiatement après, la suspension de bactéries (7 à 8 millimètres cubes). Pour faciliter la numération, la petite goutte est déposée sur le réseau d'une chambre divisée de BÜRKER où les carrés empêchent les erreurs.

Les bactéries sont colorées dans l'émulsion par du violet de méthyle formolé, pendant 30 minutes à 65° environ, selon les indications de HECKSCHER. Il est pratique de diluer la suspension avec la solution de colloïde jusqu'à ce qu'on obtienne une émulsion renfermant environ 1 000 bactéries par millimètre cube. Les numérations sur les gouttelettes desséchées peuvent être faites avec un objectif à sec ou à immersion. »

On voit donc que HENRIQUES, en plus de la distribution plus régulière des microbes, a réalisé un certain nombre d'améliorations fort importantes. Les deux principales sont incontestablement la mesure exacte, en volume, de très petites quantités de suspension microbienne, et, par voie de conséquence, la possibilité de dénombrer les microbes de la préparation toute entière. On évite ainsi les évaluations moyennes, les mesures des surfaces de l'étalement et du champ microscopique et les risques d'erreur dus à l'irrégularité, toujours possible malgré le colloïde, de la distribution des microbes. Il semble pourtant que la technique réalisée par l'auteur danois, et en particulier la préparation de ses pipettes capillaires jaugées, comporte des difficultés pénibles à surmonter pour les bactériologistes ordinaires.

2° ÉVALUATION DU NOMBRE DES MICROBES AU MOYEN D'UNE CELLULE COMPTE-MICROBES. — Cette seconde méthode de numération microscopique n'a été réellement mise au point que dans ces dernières années. Elle consiste, comme nous l'avons déjà vu, à dénombrer les microbes contenus dans un volume très petit, mais exactement connu, d'une suspension microbienne. Ce volume est mesuré à l'aide d'un appareil spécial analogue à un hématimètre. L'exactitude de la méthode dépend donc essentiellement du degré de précision des appareils livrés par les constructeurs.

En 1914, E. GLYNN, M. POWELL, A. REES, et G. LISSANT COX (83), à l'occasion d'un travail portant sur la comparaison de quatre méthodes de numération bactérienne, donnèrent les caractéristiques des cellules utilisées pour la numération directe des bactéries. Ils recommandèrent d'employer, de préférence, une cellule de 0^{mm},02 soit 1/50 de millimètre de profondeur. La numération des microbes est en effet beaucoup plus difficile que celle des hématies. Dans une numération globulaire les hématies se déposent rapidement et se placent, en quelques minutes, sur la graduation gravée au fond de la cellule. Il est alors facile de mettre au point à la fois les globules et le quadrillage et d'effectuer la numération. Les

bactéries, au contraire, sont très lentes à se sédimenter. Pour un hématimètre ordinaire, ayant $0^{\text{mm}},1$ de profondeur, on observe, même après un repos de 30 minutes, que des bactéries, en nombre considérable, sont encore en mouvement. Il est alors impossible d'avoir à la fois au point les microbes en suspension et la graduation de la cellule, et la numération devient très difficile. C'est pour éviter cet inconvénient que les auteurs américains diminuent, autant qu'il est possible, la profondeur de l'appareil. Cette diminution augmente en même temps la distance libre pour l'objectif, de sorte que la rupture de la lamelle qui recouvre la cellule se produit beaucoup plus rarement. Cette lamelle doit être parfaitement plane au point de vue optique tout en demeurant suffisamment mince. Enfin, pour obtenir une teinte légère des bactéries, il est utile d'employer, comme liquide de dilution, une solution faible de thionine phéniquée. D'après les auteurs américains cette méthode de numération est très exacte.

D'autres auteurs ont également employé des techniques analogues.

SALIMBENI (168), ne disposant pas de cellules spéciales, utilise un hématimètre ordinaire dont chaque carré correspond à $1/4000$ de millimètre cube. Par addition d'eau formolée à 1 pour 100 et légèrement colorée avec de la fuchsine, il dilue suffisamment l'émulsion microbienne de façon à obtenir un maximum de 10 germes par petit carré de l'appareil. En tenant compte du titre de la dilution examinée et du volume de l'hématimètre, il est facile de connaître le nombre de microbes par unité de volume de l'émulsion bactérienne.

C'est également avec un hématimètre de MALASSEZ que CH. HOLLANDE et G. CRÉMIEUX (109) procèdent à la numération directe du bacille tuberculeux.

FRED VLÈS (188) utilisa, pour graduer ses appareils opacimétriques, une cellule compte-microbes « ANGUS ».

En 1921, HENRICI (99) se servit également d'une cellule hématimétrique pour procéder à la numération des bactéries et à la détermination de leur longueur.

TROESTER (185), en 1922, après avoir constaté que la numération des bactéries colorées était souvent inexacte par suite des différences de teintes, conseilla de compter directement les microbes, sans aucune coloration, à l'aide d'une cellule spéciale. Il donna, pour cet appareil, les dimensions suivantes : lame porte-objet d'une épaisseur de $0^{\text{mm}},9$, profondeur de la chambre $0^{\text{mm}},05$ ($1/20$ de millimètre), lame couvre-objet bien plane de $0^{\text{mm}},2$ d'épaisseur (épaisseur relativement grande évitant la flexion de la lamelle). Il eut enfin l'idée d'employer, au lieu de la graduation micrométrique ordinaire gravée sur le fond de la cellule, un filet micrométrique introduit dans l'oculaire. Ce filet était d'abord gradué à l'aide d'un micromètre objectif. Il pouvait ainsi, en ayant un repère exact et toujours visible, compter facilement toutes les bactéries se trouvant en suspension à des niveaux légèrement différents et par suite utiliser une

cellule un peu plus profonde que celle des auteurs américains. D'après TROESTER la numération ainsi conduite est très exacte et ne présente aucune difficulté importante « car les bactéries (même les plus petites) apparaissent nettement brillantes et les divisions du filet micrométrique oculaire sont très visibles ».

On voit donc que l'introduction du micromètre oculaire a permis d'utiliser des cellules relativement grandes. Il nous semble cependant que, malgré l'existence de ce micromètre, il reste difficile de dénombrer tout à fait exactement des bactéries qui se trouvent en suspension à des niveaux différents.

Nos essais étaient depuis longtemps commencés lorsque nous avons pu nous procurer une cellule compte-microbes fabriquée par une maison française. Pour avoir des résultats comparables, nous avons continué à utiliser pour nos numérations la méthode de WRIGHT qui, nous le montrerons plus loin, présente pour nous différents avantages. Nous comparerons plus tard les résultats fournis par ces deux méthodes de numération.

3° ÉVALUATION DU NOMBRE DES MICROBES PAR NUMÉRATION MICROSCOPIQUE COMPARATIVE. — Cette méthode a été utilisée pour la première fois, en 1902, par le bactériologiste anglais WRIGHT (194). On connaît le nombre des hématies contenues dans 1 millimètre cube de sang. Si on mélange intimement un volume de sang avec un volume égal de suspension microbienne et si on détermine, après étalement sur lame, la fréquence relative des bactéries et des globules sanguins, il suffira d'une règle de trois pour connaître la quantité de microbes contenus dans 1 millimètre cube de l'émulsion microbienne. Pour effectuer la numération comparative des hématies et des bactéries, WRIGHT étalait sur une lame, à l'aide d'une autre lame ou d'une lamelle, une goutte du mélange microbe-sang. Il laissait sécher la préparation, puis il la colorait, après l'avoir fixée dans une solution de bichlorure de mercure. Il examinait ensuite un certain nombre de champs et déterminait le nombre moyen de bactéries (a) et le nombre moyen d'hématies (b) par champ microscopique. WRIGHT admettait qu'en règle générale le nombre des globules rouges était sensiblement de 5 millions par millimètre cube de sang. Le nombre x de microbes par millimètre cube de l'émulsion microbienne était alors donné par les formules suivantes :

$$\text{étant donné que } \frac{a}{b} = \frac{x}{5\,000\,000}$$
$$x = \frac{a \times 5\,000\,000}{b}$$

Cette technique, remarquable par son ingéniosité, était pourtant, en un point, fort critiquable. WRIGHT admettait que le nombre des hématies était à peu près constant et voisin de 5 millions par millimètre cube. On

sait que ce postulat n'est pas exact et que, non seulement le nombre des globules rouges varie quelquefois dans de fortes proportions suivant les différents sujets, mais qu'il peut aussi varier, pour un même individu, aux différentes heures de la journée. Il devenait donc nécessaire de déterminer chaque fois, à l'hématimètre, le nombre des hématies du sang utilisé. D'autre part, comme il se produisait souvent au cours de la préparation des coagulations intempestives qui venaient gêner la numération, on proposa d'ajouter au mélange d'émulsion microbienne et de sang soit une certaine quantité de sérum physiologique, soit, ce qui était plus efficace, un volume égal d'une solution de citrate de soude à 1,5 pour 100.

Le sang humain normal était bien plus chargé en hématies qu'une suspension microbienne servant à la préparation d'un vaccin. Les étalements étaient donc toujours bien plus riches en hématies qu'en bactéries ce qui rendait les numérations longues et moins précises. Pour remédier à cet inconvénient GEORGES DREYER (55), en 1921, proposa de substituer au sang humain, directement utilisé, une émulsion de globules sanguins de poule et d'amener ces globules nucléés à un taux assez bas (20 000 000 par centimètre cube). Il était ainsi plus facile de dénombrer microbes et globules qui, sur la préparation, se trouvaient en nombres voisins.

Il est souvent malaisé de conserver longtemps la suspension d'hématies, aussi FRIES (70), en 1921, proposa de remplacer ces hématies par de simples cellules de levure de bière, cellules de forme suffisamment nette pour ne pas pouvoir être confondues ni avec les bactéries, ni avec les précipités de colorant.

La méthode proposée par WRIGHT fut, dès le début, assez vivement critiquée. Certains auteurs, et parmi eux HARRISSON (93), pensaient que les bactéries pouvaient être enlevées de la lame pendant la coloration. D'autres soutenaient qu'un certain nombre d'entre elles, dissimulées sous les globules, pouvaient échapper à la numération.

LEISHMAN (127) craignait même que le plasma sanguin, mis en présence des microbes, arrive très rapidement à en bactériolysé une partie. Ces critiques étaient évidemment exagérées, du reste on a vu que les améliorations apportées à la technique primitive rendent certaines d'entre elles inopérantes. La remarque de HARRISSON mérite toutefois d'être prise en considération et il sera utile de procéder avec précautions aux opérations de la coloration. Il existe d'ailleurs une modification de la méthode où le risque invoqué par cet auteur n'est pas à craindre. Au lieu de procéder à la fixation, puis à la coloration de la lame après l'étalement, on se borne à ajouter au mélange (sang et émulsion microbienne) une goutte de solution aqueuse à 1 pour 100 de bleu de méthylène. Après avoir étalé une goutte du mélange, on laisse sécher la préparation et, sans aucune autre opération, on procède à la numération. Les bactéries, très légèrement teintées en bleu, sont parfaitement visibles.

Ces différentes objections étant ainsi écartées, il n'en reste pas moins

vrai que l'exactitude de cette méthode dépend essentiellement d'une répartition uniforme des microbes et des hématies dans les divers étalements. Pour obtenir de bonnes préparations et éviter les amas microbiens, il est indispensable de partir d'une émulsion bactérienne bien homogène et de renoncer à l'emploi d'une lame ou d'une lamelle pour effectuer les étalements. En effet, si l'on opère comme WRIGHT et quelques-uns de ses successeurs le conseillent, il arrive presque toujours que les bactéries adhèrent plus fortement que les globules à la lamelle utilisée pour effectuer les préparations. REES (83) a trouvé, par exemple, que le rapport des microbes aux hématies était souvent 2 à 3 fois plus grand dans la petite goutte restée sur la lame ou la lamelle ayant servi à répartir le mélange que dans la partie fixée sur la lame porte-objet. De plus, lorsqu'on opère avec une lame, les bactéries, plus petites, sont laissées en arrière dès le début de l'étalement tandis que les hématies, plus grosses, sont entraînées plus facilement. La préparation s'enrichit donc en hématies au fur et à mesure du déplacement de la lame. Enfin il arrive qu'en opérant avec du sang, les microbes se mêlent aux plaquettes sanguines dont il est assez difficile de les distinguer.

Les erreurs provoquées par des étalements irréguliers expliquent sans doute les résultats trouvés par GLYNN, POWELL, REES et COX (83). Ces auteurs comparèrent particulièrement les résultats donnés par la méthode de WRIGHT aux résultats fournis par la méthode de numération au moyen d'une cellule compte-microbes. Pour cela deux observateurs étudièrent la même émulsion par chacune de ces méthodes et firent comme test de précision, le pourcentage de la différence avec la moyenne arithmétique des deux numérations. Ils examinèrent ainsi de nombreuses émulsions de staphylocoques, de streptocoques et de colibacilles et obtinrent des résultats remarquablement réguliers. De la comparaison des chiffres trouvés il résulte que la numération au moyen de la cellule compte-microbes, tout en étant la plus rapide, donne une erreur plus petite que 5 pour 100, avec un minimum de 0,50 pour 100 et un maximum de 21 pour 100, alors que la méthode de WRIGHT donne une erreur plus grande que 15 pour 100, avec un minimum de 1,1 pour 100 et un maximum de 54 pour 100. Ces chiffres n'ont pas une valeur absolue et montrent simplement que la seconde méthode est plus irrégulière que la première, ce qui est du reste tout à fait logique. En effet, la méthode de WRIGHT comportant deux opérations successives sera soumise à deux causes d'erreur qui, suivant les cas, peuvent s'additionner ou se neutraliser en partie. La première erreur a trait à la numération des globules rouges à l'hématimètre, elle est, d'après BURKER, voisine de 7 pour 100. La seconde, qui paraît la plus importante, se rapporte à la numération relative des microbes et des hématies. Nous avons vu pourtant qu'il était possible de la diminuer fortement en prenant certaines précautions. Il faudra notamment parcourir un grand nombre de champs microscopiques pris au hasard sur de nombreuses préparations.

La méthode de WRIGHT présente, par contre, un certain nombre d'avantages. Elle ne nécessite l'emploi que d'un hématimètre ordinaire, appareil classique, beaucoup plus facile à se procurer que les cellules compte-microbes. Les étalements, fixés et colorés, se conservent bien, on pourra donc mettre à part les lames ainsi préparées et ne procéder à leur numération qu'au bout d'un certain temps ce qui présente pour nous un gros intérêt. En effet, pour suivre la multiplication microbienne, nous étions obligés de faire, pendant les premières heures, des prélèvements trop nombreux pour pouvoir les étudier tous dans la même journée ou même pendant les jours suivants. Enfin, en conservant et en comparant nos lames, nous pouvions nous rendre compte des changements survenus dans la taille ou la forme de nos bactéries. Si nous faisons remarquer en outre que, pour l'étude des premiers jours d'une culture microbienne, il est possible d'utiliser la même émulsion de levure et qu'on supprime ainsi une cause d'erreur sur deux, on voit que, pour le cas qui nous occupe, la méthode de WRIGHT, légèrement perfectionnée, est capable de donner de très bons résultats. Nous exposerons plus loin comment nous avons modifié cette méthode avant de l'employer pour nos recherches personnelles.

Comme nous l'avons déjà dit, toutes les méthodes dont nous venons d'exposer les principes (mesure du volume ou pesée de la masse microbienne, évaluation de la perte qu'elle fait subir aux rayons lumineux qui la traversent, numération directe par étalement et coloration ou par l'emploi d'une cellule compte-microbes, numération comparative) donnent l'ensemble des bactéries aussi bien « mortes » que « vivantes ». Il peut être pourtant fort intéressant de connaître séparément le chiffre des bactéries « vivantes ». Ce nombre nous sera donné par les méthodes que nous allons maintenant passer en revue.

II. — MÉTHODES DONNANT LE NOMBRE DES MICROBES « VIVANTS » PRÉSENTS DANS LA CULTURE

Plusieurs procédés permettent d'obtenir le nombre des microbes « vivants », présents dans un volume déterminé d'un liquide.

Les uns, utilisés dès les premières heures de la bactériologie, reposent sur l'idée qu'il est possible, par des dilutions convenables, de séparer suffisamment les bactéries pour que toute preuve de multiplication microbienne (trouble d'un bouillon, apparition d'une colonie) puisse être considérée comme le témoin de l'existence d'une seule bactérie vivante.

Les autres, mis au point récemment et encore à l'étude, sont basés sur l'idée qu'il est possible de distinguer, au microscope, les bactéries vivantes des bactéries mortes. On utilise pour cela soit le fait que, dans certaines conditions, les bactéries vivantes ne se colorent pas alors que les bactéries mortes prennent avec force le colorant, soit le phénomène

moins connu que les bactéries, sur le point de se multiplier, prennent certains aspects morphologiques qui les rendent reconnaissables.

Il est bien évident que ces deux groupes de procédés pourront dénombrer des microbes de qualité différente. Tandis que le microscope cherchera à évaluer toutes les bactéries vivantes dans le milieu originel, les ensemencements sur milieux divers ne donneront que les bactéries vivantes capables de se reproduire en subculture. Or, il apparaît sans aucun doute, qu'un microbe peut fort bien être capable de se multiplier dans le milieu où il est né (dans les premières heures de la poussée) sans pour cela pouvoir se multiplier dans un milieu neuf où on l'a transporté. Bien plus, il est vraisemblable, et les expériences de HEHEWERTH (98) semblent le prouver, que, suivant la qualité du milieu de réensemencement (milieu liquide, milieu solidifié à la gélose, milieu solidifié à la gélatine), la quantité des microbes capables de se reproduire en subculture pourra être différente. Pour éviter tout risque de confusion, nous réserverons généralement le terme trop vague de « microbes vivants » et nous le remplacerons par celui de « microbes capables de se reproduire dans telle ou telle subculture ».

Nous allons examiner maintenant les principaux procédés utilisés.

A. — Détermination du nombre des microbes « vivants » par ensemencements en milieux nutritifs.

I^o ÉVALUATION DU NOMBRE DES MICROBES VIVANTS PAR DILUTION ET ENSEMENCEMENTS EN MILIEUX LIQUIDES. — PASTEUR exposa le premier le principe de cette méthode. Dès 1860, il montra qu'en ouvrant à l'air, en différents endroits, des ballons privés d'air et contenant des liquides nutritifs stériles, on ensemait un nombre variable de ceux-ci. En comparant le nombre des ballons contaminés au nombre total des ballons utilisés, on avait une idée approchée de la teneur en microbes de l'air examiné.

Dans les années qui suivirent, KLEBS (113) en 1873, LISTER en 1878, et MIQUEL (142) en 1879 perfectionnèrent ce procédé et, dès 1880, ce dernier auteur publia des statistiques sur la teneur de l'air et de l'eau en moisissures et en bactéries. La méthode imaginée par ces auteurs repose sur les principes suivants :

a) il est possible d'isoler nettement les unes des autres les bactéries d'une suspension microbienne. Il suffit pour cela de diluer suffisamment cette suspension en procédant à des agitations successives avec des quantités connues d'eau stérile ;

b) en ensemençant, par fractions égales, dans une série de tubes de culture une quantité donnée d'une dilution ainsi préparée, on constate, si la dilution est assez forte, que certains tubes ensemencés restent stériles. Si la multiplication microbienne n'a eu lieu, au maximum, que dans 15 à 20 pour 100 des tubes mis en œuvre, on observe que les cultures ainsi produites sont presque toujours des cultures pures. On peut donc admettre

que l'ensemencement n'avait apporté qu'un seul germe initial dans chacun des tubes ayant cultivé, et que le nombre des tubes altérés représente le nombre des microbes contenus dans la quantité totale ensemencée. En tenant compte de la dilution, il est facile de connaître le nombre des microbes vivants contenus dans l'unité de volume de la suspension primitive.

Pour appliquer cette méthode MIQUEL préparait des dilutions à 1/100, 1/1 000, 1/10 000, etc..., du liquide à examiner. Il répartissait ensuite chacune de ces dilutions, à la dose de 1 centimètre cube par exemple, dans des séries de 10 tubes de bouillon. Après plusieurs jours de séjour à l'étuve il était facile de choisir la série de tubes présentant 15 à 20 pour 100 de résultats positifs. Si par exemple deux des dix tubes ensemencés avec la dilution à 1/1 000 avaient donné naissance à une culture, il était facile de calculer que l'eau à examiner contenait sensiblement

$$\frac{2 \times 1\,000 \times 1\,000}{10} = 200\,000 \text{ bactéries par litre.}$$

Ce même principe est encore utilisé pour la numération du bacille coli dans l'eau au moyen de la méthode mise au point par M. le P^r RADAIS. Le milieu de culture utilisé est ici une eau peptonée lactosée tournesolée additionnée d'acide phénique. Ce liquide, qui ne convient pas pour la culture des autres bactéries de l'eau, permet cependant la multiplication du bacille coli et l'acidité produite fait virer au rouge la teinture de tournesol.

Il est possible d'interpréter d'une autre manière les résultats fournis par cette méthode de dilutions successives suivies d'ensemencements en milieux liquides. On peut chercher à déterminer quelle est la dilution minimum qui ne donne plus de résultats positifs lorsqu'on en ensemence une quantité déterminée dans des milieux convenables. Si par exemple la multiplication microbienne se produit dans un milieu ensemencé avec une dilution à 1/100 000, et si elle ne se produit pas dans le même milieu ensemencé avec une dilution à 1/1 000 000, on peut admettre qu'il y a, par unité de volume ensemencé, au moins 100 000 organismes mais qu'il y en a moins de 1 000 000. Il est évident que ce raisonnement ne pourra être appliqué qu'à des résultats moyens. Il faudra donc ensemencer un certain nombre de tubes avec chacune des dilutions. Cette méthode a surtout été utilisée par les auteurs américains, en particulier pour la numération du bacille coli dans les eaux. Elle a fait l'objet de nombreux travaux publiés surtout dans *The Standard Methods for the Examination of Water and Sewage of the American Public Health Association 1920*. La technique la plus simple consiste à utiliser des dilutions de 10 en 10 fois plus fortes. Quand on ensemence un seul tube de milieu nutritif avec chaque dilution, le nombre d'organismes présents par unité de volume de la suspension originale peut être évalué comme l'inverse de la plus petite fraction de l'unité de volume donnant une poussée.

Si, par exemple, les dilutions donnent les résultats suivants :

$$1\text{ cm}^3 + ; \quad 0\text{ cm}^3, 1 + ; \quad 0\text{ cm}^3, 01 + ; \quad 0\text{ cm}^3, 001 0 ; \quad 0\text{ cm}^3, 0001 0,$$

on peut dire que le nombre d'organismes est de 100 par centimètre cube.

Si dans la série il y a un 0 suivi d'un +, comme dans les résultats suivants :

$$1\text{ cm}^3 + ; \quad 0\text{ cm}^3, 1 \text{ 0} ; \quad 0\text{ cm}^3, 01 + ; \quad 0\text{ cm}^3, 001 \text{ 0},$$

le nombre *probable* est pris comme l'inverse de la dilution qui précède juste le dernier résultat positif, soit 10 par centimètre cube dans le cas qui nous occupe.

Pour avoir des résultats plus précis, il faut ensemençer plusieurs tubes avec la même dilution. Une étude complète a montré aux auteurs américains qu'en pratique l'exactitude était suffisante en procédant par séries de 5 tubes.

Divers auteurs : MAC CRADY (46) en 1915, WOLMAN et WEAVER (193) en 1917, STEIN (182) en 1919, GREENWOOD et YULE (87) en 1917, et de nouveau MAC CRADY (47) en 1918, ont établi des relations mathématiques pour obtenir le nombre probable de colibacilles présents par centimètre cube, en se basant sur les essais positifs des diverses dilutions. D'après BUCHANAN et FULMER (30), l'utilisation directe de ces formules est assez laborieuse mais peut donner cependant de bons résultats.

On voit donc que ces différents procédés, basés sur des dilutions progressives suivies d'ensemencements en milieux liquides, ne sont plus guère employés que pour la numération du colibacille dans les eaux. On ne doit pourtant pas oublier, comme le fait remarquer MIQUEL (145), que ces techniques avaient permis de résoudre de nombreux problèmes bactériologiques, d'obtenir des cultures pures et de pratiquer des analyses bactériologiques quantitatives de l'air, du sol et des eaux, quatre ou cinq ans avant la découverte des procédés de séparation des microbes au moyen des milieux solidifiés par la gélatine.

2° ÉVALUATION DU NOMBRE DES MICROBES VIVANTS PAR DILUTION ET ENSEMENCEMENTS SUR MILIEUX SOLIDIFIÉS PAR LA GÉLATINE OU LA GÉLOSE. — En 1884, KOCH eut l'idée de mêler les suspensions microbiennes à des bouillons nutritifs gélatinés, liquéfiés à basse température, et de couler le mélange sur des plaques de verre flambées et parfaitement horizontales. En recouvrant d'une cloche de verre le mélange solidifié, et en laissant les plaques ainsi préparées à une température de 24°, température insuffisante pour liquéfier la gélatine, on assiste à l'éclosion des germes « qui, ne pouvant se déplacer, sont contraints de se multiplier dans une zone très limitée et donnent ainsi naissance à des colonies que l'on peut compter à l'œil nu ou mieux à la loupe ». Chaque colonie observée correspond à un germe initial, en faisant la somme des colonies ainsi produites on obtient le nombre des microbes vivants contenus dans la quantité ensemencée.

L'emploi de cette méthode se généralisa rapidement. PÉTRI préconisa, à la place des plaques de verre, les boîtes qui portent son nom. D'autres

auteurs proposèrent, avec moins de succès, l'emploi d'autres récipients : flacons coniques, flacons triangulaires, tubes spéciaux d'ESMARCK (62), etc.

Les milieux gélatinés présentaient de gros inconvénients. D'une part il était impossible de les porter à 37°, température optima pour la culture de la plupart des microbes, d'autre part un grand nombre de bactéries liquéfiaient ces milieux. On se trouvait donc obligé d'arrêter les expériences avant le temps nécessaire au développement de toutes les colonies. Le remplacement de la gélatine par la gélose, qui ne présente pas ces inconvénients, permit d'obtenir plus facilement de meilleurs résultats. Il est inutile que nous insistions sur les services immenses que ces méthodes bien connues ont rendu et rendront encore à la bactériologie. Nous allons voir simplement de quelle façon certains auteurs les utilisèrent, et souvent les perfectionnèrent, dans le but d'étudier quantitativement la multiplication microbienne.

En 1887, BÜCHNER, LONGARD, RIEDLIN (31) employèrent, pour la numération des bactéries, la méthode des plaques de gélatine. Ils préconisèrent, pour le dénombrement des colonies, non pas l'emploi de la loupe, mais l'utilisation du microscope. On compte les colonies contenues dans 10 à 30 champs microscopiques, on fait la moyenne et, connaissant la grandeur du champ et la surface de la plaque, on en déduit le nombre total des colonies. Les auteurs recommandaient d'étaler aussi uniformément que possible la gélatine, de telle sorte que son épaisseur ne soit pas trop grande et que sa surface soit parfaitement plane. Ils conseillaient, en outre, de disposer dans l'oculaire des doubles fils perpendiculaires délimitant un petit carré central de surface parfaitement définie. Ils arrivaient ainsi à compter, par plaqueensemencée, jusqu'à cinq ou dix millions de colonies. Il est à noter que, trois ans auparavant, un français PROUST (156), dans ses études sur la teneur de l'eau en bactéries, avait utilisé, pour compter les colonies produites sur plaques de gélatine, un microscope donnant un grossissement trente fois plus fort que le grossissement d'une loupe ordinaire.

En 1893, BRUNNER et ZAWADZKI (26) utilisèrent les boîtes de PETRI et se contentèrent de compter les colonies à la loupe. Pour éviter de passer en revue toute la préparation, ils disposèrent sous la boîte un disque de papier noir divisé en 16 secteurs de même surface. Après avoir examiné un certain nombre de ceux-ci, on faisait la moyenne et il suffisait de multiplier le chiffre trouvé par un coefficient déterminé pour connaître le nombre total des colonies.

La même année, LAFAR FRANZ (118) préconisa un système analogue pour diviser la surface d'une boîte de PETRI en portions égales. Ces portions, d'une surface de 1 centimètre carré, étaient délimitées par un système de doubles lignes que l'on plaçait sous la boîte à examiner.

En 1894, MILLER (140) signala qu'il pouvait se produire sur le couvercle des boîtes de PETRI une condensation de vapeur d'eau. Cet inconvénient,

surtout fréquent dans les petites étuves où la température est toujours un peu plus élevée à la partie inférieure, peut être aisément supprimé, comme le montra cet auteur, en plaçant les boîtes à l'étuve couvercle en dessous.

Un an plus tard, en 1895, MAX MÜLLER (146) compara les différents procédés utilisés pour la numération des colonies développées sur gélose. Il constata qu'il était possible de compter à l'œil nu jusqu'à 300 ou 500 colonies pour une boîte de PETRI ordinaire. Pour des nombres plus élevés, de 500 à 8 000 colonies, il préconisa l'emploi de la loupe avec repères donnés par les carrés, petits ou grands, de l'appareil de WOLFFHÜGEL. Enfin, pour lesensemencements plus riches, il utilisa le microscope. Il était difficile de dénombrer sans repères plus de 30 à 50 colonies par champ de microscope. Mais en employant, d'une part, les fils en croix intraoculaires proposés par BÜCHNER, LONGARD et RIEDLIN et, d'autre part, l'appareil de WOLFFHÜGEL par exemple, on arrive à compter jusqu'à 100 à 150 colonies par champ microscopique. Il suffit pour cela d'amener au point, en même temps, au moyen d'un artifice optique, les colonies et les petites divisions de l'appareil. On peut ainsi dénombrer plus de 200 000 à 300 000 colonies par boîte de PETRI.

Une étude semblable fut faite, la même année, par MAX NEISSER (148). Cet auteur se demanda tout d'abord s'il valait mieux, pour effectuer la numération des colonies, utiliser la loupe ou le microscope. Il fit d'abord les remarques suivantes, qui paraissent favorables à la numération microscopique :

a) les colonies, surtout quand elles sont nombreuses, ont des grandeurs très diverses. Certaines d'entre elles, trop petites, échappent de ce fait à l'observation à la loupe ;

b) il arrive souvent que deux colonies se superposent ou se développent très près l'une de l'autre. Elles peuvent donc être comptées, si on utilise la loupe, comme une seule colonie ;

c) le maximum qu'il est possible de compter, à la loupe, sans erreur notable, ne dépasse pas 20 000 colonies pour une boîte de PETRI ordinaire. La numération à la loupe nécessite donc des dilutions plus grandes que la numération au microscope ce qui peut entraîner des erreurs supplémentaires ;

d) enfin, quand on utilise des ensemencements sur gélatine, il importe de terminer la numération le plus rapidement possible pour devancer, si elle doit avoir lieu, la liquéfaction du milieu. Il est évident que, dans ce cas, ce sera la numération microscopique qui donnera les résultats les plus rapides.

Pour vérifier cette supériorité théorique de la numération microscopique, et pour préciser certains détails (grandeur du champ microscopique, nombre de champs à examiner, nombre maximum de colonies de même espèce ou d'espèces différentes qu'il est possible d'évaluer), MAX NEISSER effectua toute une série d'essais comparatifs qui le conduisirent aux conclusions suivantes :

a) pour des cultures pures, et pour un ensemencement donnant plus de 1 500 colonies par boîte de PETRI, la numération microscopique est supérieure à la numération à la loupe. L'erreur maxima varie de $+\frac{1}{7}$ à $-\frac{1}{8}$ quand on examine 30 champs microscopiques ;

b) pour des cultures pures, avec un ensemencement de 600 à 1 500 colonies par boîte, les erreurs de la numération microscopique sont plus grandes, et il faut arriver à un examen de 60 champs pour atteindre une limite d'erreur de $+\frac{1}{3}$ ou de $-\frac{1}{4}$;

c) pour des cultures pures, avec un ensemencement de 300 à 600 colonies, il faut examiner 90 champs et l'on peut encore faire une erreur de $\pm \frac{1}{2}$.

Dans ce cas, une numération soigneuse, faite à la loupe, donne des résultats de même valeur ou même supérieurs ;

d) pour des cultures pures, avec 150 colonies et moins, la numération microscopique n'est pas indiquée ;

e) les cultures impures doivent être comptées microscopiquement car on peut y rencontrer de « petites colonies ».

On voit donc que la supériorité de la numération microscopique n'existe guère que pour des ensemencements très importants. Ce fait fut d'ailleurs confirmé par HEHEWERTH (98) en 1901. Nous essaierons de voir, plus loin, si ce procédé constitue réellement un avantage.

En 1904, ELJKMAN (60) fit remarquer que, pour pouvoir procéder à une bonne numération des colonies, il était nécessaire de donner aux plaques de gélatine une épaisseur tout à fait uniforme. Pour atténuer les irrégularités que présente toujours le fond des boîtes de PETRI, il eut l'idée de couler dans la boîte, placée horizontalement, une couche de gélose stérile. Il versait ensuite la gélatine ensemencée sur cette gélose solidifiée et parfaitement plane. On obtenait ainsi une répartition régulière des germes, ce qui facilitait beaucoup le dénombrement.

JANET E. LANE CLAYPON (41), en 1909, utilisa, pour faire ses ensemencements, des plaques de gélose. Pour éviter de trop grandes dilutions, elle employa des pipettes capillaires dont toutes les gouttes représentaient $0\text{ cm}^3,02$. Elle recommanda en outre d'effectuer rapidement les dilutions en eau distillée, ce liquide pouvant avoir, à la longue, une action nocive sur les bactéries.

Cette méthode d'ensemencement, au moyen de gouttes très petites, fut également utilisée par H. CHICK (38), en 1912, pour des essais sur plaques de gélatine.

En 1914, PENFOLD (151) modifia la technique proposée par ELJKMAN. Une certaine quantité de milieu gélosé était tout d'abord coulée dans chaque boîte de PÉTRI. Après refroidissement, on ajoutait le volume fixé de l'émulsion bactérienne que l'on mêlait à une nouvelle quantité de gélose liquéfiée. Enfin, au bout de cinq minutes d'attente, on versait une dernière fraction de gélose liquide juste suffisante pour recouvrir la seconde couche.

En 1920, GRAHAM SMITH (181) renonça à utiliser des pipettes normales ou capillaires pour effectuer sesensemencements. Il employa dans ce but, comme l'avait déjà fait HEHEWERTH, une anse standard contenant $0^{\text{cm}^3},01$ de liquide. Cette anse, chargée de suspension microbienne, était essuyée, soit directement dans la gélose liquide, soit, pour dilution, dans de petites quantités d'eau stérile. Après agitation, on reportait une anse standard de la dilution ainsi obtenue dans le milieu à ensemenecer. La numération des colonies était faite à l'aide du microscope et des plaques graduées, les résultats obtenus étaient inscrits par une machine enregistreuse.

Enfin en 1922, JOHANNES ZEISZLER (197) conseilla d'employer un microscope binoculaire pour la numération des colonies.

Entre temps, divers auteurs parmi lesquels OTTO RAHN (157) en 1906, CHESNEY (37) en 1916, GATES (79), COHEN et CLARK (42), CLARK et RUEHL (40) en 1919, WILSON (190) en 1922, utilisèrent la méthode des plaques de gélose mais sans lui apporter des modifications notables.

En examinant ces divers essais, on se rend compte que les auteurs précédents cherchaient avant tout à satisfaire aux deux conditions suivantes :

- a) effectuer le plus rapidement possible la numération des colonies ;
- b) éviter, pour faire lesensemencements, de recourir à de trop fortes dilutions de la suspension originelle.

Que devons-nous penser de ces deux directives.

La nécessité de terminer rapidement la numération des colonies était justifiée lorsqu'on utilisait les milieux gélatinés. Il était indispensable de pouvoir arrêter l'expérience avant que la liquéfaction de la gélatine, produite par certains microbes, soit venue fausser les résultats. Les auteurs allemands tenaient donc à déceler très vite toutes les colonies, même les plus petites, et ils étaient, de ce fait, conduits à utiliser le microscope. Cette préoccupation n'a plus maintenant autant d'importance. Le remplacement de la gélatine par la gélose permet, en effet, d'obtenir des milieux nutritifs, solides à la température de 37° , et non liquéfiables par les bactéries.

Le désir d'éviter l'emploi de trop grandes dilutions de la suspension microbienne à examiner garde, par contre, une certaine valeur. Des dilutions trop importantes peuvent apporter avec elles de nouvelles causes d'erreur. Pour les éviter, certains auteurs comme BÜCHNER et ses collaborateurs, MÜLLER, NEISSER préfèrent compter, grâce au microscope, desensemencements très riches donnant jusqu'à un million de colonies par boîte de PÉTRI. D'autres chercheurs, et en particulier les auteurs de langue anglaise, s'ingénierent à effectuer desensemencements définis, aussi réduits que possible, en utilisant pour cela soit des pipettes capillaires (CLAYTON, CHICK), soit des anses standards (HEHEWERTH, SMITH). Nous devons cependant nous demander si ces procédés sont véritablement efficaces.

Nous ne pensons pas que les ensemencements extrêmement riches, suivis d'une numération microscopique, aient donné aux auteurs allemands une exactitude bien plus grande. Il nous semble difficile, même en utilisant les appareils préconisés par ceux-ci (fils intraoculaires, projection dans le champ microscopique d'images graduées) de compter très exactement les colonies contenues dans un champ microscopique. Ces colonies sont en effet très nombreuses (100, 200 ou plus par champ), elles sont très souvent, en raison de ce nombre, accolées, superposées ou même étroitement unies, enfin elles ne sont pas situées dans le même plan et il faudra, pour les observer toutes, déplacer « le point » sans qu'il soit possible d'utiliser pour cela des repères définis. Nous pouvons donc admettre que cette numération élémentaire comporte déjà une erreur sensible. Comme il est impossible de parcourir au microscope la plaque entière, les auteurs se sont bornés à prendre la moyenne d'un certain nombre de champs (30 généralement, quelquefois 60 ou 90) et à multiplier ce chiffre moyen par le nombre de champs (nombre voisin de 1500) contenus dans la plaque à examiner. Sans tenir compte des difficultés techniques que présente cette opération (mesure exacte du champ du microscope et de la surface de la boîte, définition précise des oculaires et des objectifs utilisés, détermination de la longueur du tube, etc...); on peut dire qu'il faut, pour que cette opération soit exacte, que l'ensemencement soit absolument régulier sur toute la surface de la boîte de Petri. Or ce résultat ne peut pas être atteint. Tout d'abord le mélange de la suspension microbienne et de la gélose liquide n'est pas parfait. On opère, en effet, à 45° pour ne pas nuire à la vitalité des germes et, à cette température relativement basse, la gélose est déjà visqueuse. En outre, pour obtenir une répartition exacte, il faudrait que le fond de la boîte de Petri soit rigoureusement plan et que les bords de celle-ci s'en détachent strictement à angle droit. Ce sont là des qualités qu'il est bien difficile de rencontrer dans un matériel ordinaire. Nous avons donc ici de nouvelles causes d'erreur et c'est pourquoi nous croyons que les méthodes proposées par les auteurs allemands, malgré leur aspect rigoureux, ne semblent pas atteindre, de façon certaine, le but cherché.

Que devons-nous penser maintenant des procédés utilisés par les auteurs anglais? Il nous semble d'abord difficile d'obtenir des mélanges parfaitement homogènes en partant de liquides de viscosités différentes et en utilisant pour l'un (bouillon gélifié) de dix à quinze centimètres cubes et pour l'autre (eau ou bouillon) un ou deux centièmes de centimètre cube. La graduation des pipettes capillaires et surtout celle des anses jaugées doit présenter d'assez grandes difficultés. Enfin, comme nous l'avons déjà dit à propos de l'évaluation du nombre des microbes par numération microscopique directe, les modifications des propriétés physiques des milieux de culture (viscosité, tension superficielle) au cours de la poussée bactérienne ne permettent pas d'obtenir des prélèvements uniformes, en employant pour cela des pipettes capillaires jaugées en gouttes,

ou des anses de platine étalonnées. Du reste, si l'on pouvait admettre l'utilisation de ces appareils, l'économie de dilution ainsi réalisée serait très faible. Nous pouvons, en effet, mesurer à la pipette, avec une grande exactitude, des quantités de liquide de l'ordre du $1/10$ de centimètre cube soit seulement 10 fois plus grandes que celles qu'utilisent les auteurs anglais.

Les grandes dilutions, que les auteurs précédents cherchent tant à éviter, provoquent-elles vraiment des erreurs importantes ? Nous avons vu plus haut que des bactériologistes, comme MIQUEL, ne craignaient pas de recourir à des dilutions successives, et obtenaient cependant des résultats très intéressants. Il est vrai que MIQUEL s'adressait à des liquides (eaux potables et eaux non potables) dont la teneur en microbes était beaucoup plus faible que celle des suspensions microbiennes que nous analysons. Nous pensons pourtant qu'en prenant les précautions nécessaires, nous pouvons effectuer de fortes dilutions, sans charger le résultat final de trop grands risques d'erreurs.

La première critique, que l'on puisse faire à la méthode des dilutions, est qu'il est difficile de réussir à répartir également des bactéries dans toute la masse d'un liquide. Il subsiste presque toujours des amas microbiens, plus ou moins considérables, qui, après ensemencement, donneront naissance à une seule colonie. Cette objection s'applique en réalité, non pas à la pratique des dilutions, mais à la méthode même de numération des colonies sur plaque de gélose. Elle est valable dès le début de l'essai et s'adresse tout particulièrement aux techniques employées par les auteurs étrangers. C'est d'ailleurs pour cela que, lorsque certains de ceux-ci veulent améliorer les résultats donnés par ces méthodes, ils commencent par diluer la suspension microbienne pour mieux en séparer les bactéries. HEHEWERTH (98), après expérience, s'est montré défavorable à cette dilution supplémentaire mais il ne semble pas qu'il ait pris toutes les précautions nécessaires (agitations prolongées, billes de verre) pour obtenir de bons résultats.

Il n'y a qu'une façon de diminuer cette première cause d'erreur. Il faudra dissocier le plus possible les amas microbiens par des agitations vives et prolongées en présence de billes de verre et effectuer les premières dilutions, non pas dans des liquides visqueux comme des géloses ou des gélamines liquéfiées à basse température (comme étaient amenés à la faire les auteurs que nous avons cités), mais dans des liquides fluides comme l'eau, l'eau salée ou le bouillon. On procédera chaque fois à des transports de volumes assez grands, pour qu'ils soient nettement mesurés, et à des agitations nombreuses, vives et prolongées en présence de billes de verre.

Il est d'ailleurs à noter que toutes les bactéries ne présentent pas une égale résistance à l'exacte répartition de leurs éléments. Les microbes qui donnent des voiles épais comme les bacilles du groupe subtilis sont extrêmement difficiles à séparer les uns des autres. On aura, par contre,

beaucoup moins de peine à briser les amas ou les voiles légers que présentent des bacilles mobiles, disséminés dans toute la masse du bouillon de culture, tels que les bacilles du groupe typhique ou le bacille pyocyanique, bacille avec lequel nous avons effectué nos essais.

On peut encore faire à cette méthode une seconde critique, d'ailleurs moins importante que la précédente. En effectuant les dilutions dans l'eau distillée ou dans l'eau physiologique, on laisse pendant un certain temps les microbes en contact avec ces liquides qui peuvent exercer sur eux une action nocive. Cette action signalée par divers auteurs, parmi lesquels R. LEGROUX et G. ELIAVA (121) en 1921, DUTHOIT (57), (58) en 1923, SHERMAN et ALBUS (176) en 1924, WINSLOW et BROOKE (192) en 1927, semble ici négligeable étant donné la faible durée de l'opération.

Finalement nous pensons qu'il est possible d'utiliser des dilutions suffisamment grandes pour ne renfermer, au plus, que quelques centaines de microbes par unité de volume. En ensemençant cette unité de volume, 1 centimètre cube par exemple, sur une plaque de gélose que l'on portera ensuite à l'étuve à 37°, il sera facile de compter, à la loupe ou même à l'œil nu, toutes les colonies ayant pris naissance après un séjour suffisant à cette température. C'est sur ce principe que repose la technique que nous avons utilisée pour nos recherches.

3° COMPARAISON DES RÉSULTATS DONNÉS PAR LES MÉTHODES DE NUMÉRATION MICROSCOPIQUE DE LA TOTALITÉ DES ÉLÉMENTS MICROBIENS AUX RÉSULTATS FOURNIS PAR LES MÉTHODES DE NUMÉRATION DES MICROBES VIVANTS PAR ENSEMENCEMENTS EN MILIEUX NUTRITIFS. — En 1901, HEHEWERTH (98) étudia comparativement la méthode de KLEIN (115) (numération directe des bactéries au microscope) et la méthode de NEISSER (148) (numération des colonies sur plaques de gélose ou de gélatine). Pour obtenir une suspension microbienne ne renfermant presque uniquement que des bactéries vivantes, il utilisait une culture en bouillon de bacille coli, culture âgée de huit heures et obtenue à partir d'une souche également jeune. Il supposait qu'une telle culture ne renfermait qu'un nombre infime de bactéries mortes, d'abord parce que, d'après lui, les bacilles ne pouvaient pas avoir trouvé la mort en un temps aussi court, et aussi parce que HENRI WINTERBERG avait constaté que, dans une culture de 24 heures de colibacilles presque tous les individus étaient mobiles. HEHEWERTH constata que la méthode de KLEIN donnait toujours des résultats plus grands que la méthode de NEISSER. Comme il avait admis par avance que tous les microbes visibles étaient vivants et devaient donner des colonies, il déclara que la seconde méthode était moins exacte que la première. La méthode de NEISSER comporterait donc un certain nombre d'erreurs. Parmi celles-ci (mauvais calibrage de l'anse standard, numération inexacte des colonies, etc...), HEHEWERTH admit que la plus importante tenait à une mauvaise répartition des bactéries dans la suspension à examiner. Les microbes, au lieu d'être suffisamment écartés les uns des autres, resteraient accolés et

chaque amas bactérien ne donnerait naissance qu'à une seule colonie. Il eut alors l'idée de procéder à des dilutions supplémentaires mais, comme nous l'avons déjà dit, il n'obtint pas de meilleurs résultats. Enfin, comparant les résultats donnés par des ensemencements sur plaques de gélose à des ensemencements identiques faits sur plaques de gélatine, il remarqua que les milieux gélatinés pouvaient donner naissance à un plus grand nombre de colonies.

D'autres auteurs comparèrent également ces deux méthodes de numération.

EIJKMAN (60) en 1904, dans ses études sur la multiplication du colibacille en milieu gélatiné, signala, lui aussi, que le nombre des bactéries, calculé à partir de la méthode des plaques de gélatine, était toujours plus petit que le nombre trouvé par la méthode de KLEIN.

En 1913, GLYNN, POWELL, REES et COX (83), à propos du titrage des vaccins, firent la même constatation et donnèrent la préférence aux méthodes de numération microscopique directe.

Enfin, en 1922, WILSON (190) fit une étude très soignée des nombres de cellules de *Bact. suipestifer* déterminés par numération microscopique et par tubes roulés. Dans tous les cas, le nombre obtenu par cette dernière technique se montra le plus bas.

Que devons-nous conclure de tous ces résultats. Du fait (retrouvé par nous) que les nombres trouvés par une méthode de numération directe sont toujours plus grands que les nombres obtenus par une méthode d'ensemencements sur plaques de gélose, on ne peut pas être en droit de conclure que la seconde méthode donne des résultats moins exacts que la première. En effet, il peut se trouver, parmi les éléments microbiens, bon nombre d'organismes incapables de se multiplier *sur un milieu neuf solidifié*. Ceci ne veut pas dire que ces éléments soient tous véritablement morts. Nous admettons, pour notre part, qu'une bonne partie d'entre eux reste capable de se multiplier dans le milieu même, milieu liquide, où ils ont pris naissance. Nous pensons donc simplement, et nous le montrerons plus loin, que les méthodes de numération des bactéries par ensemencements sur milieux solidifiés donnent seulement le nombre d'une catégorie relativement restreinte de ces bactéries, cette catégorie comprenant vraisemblablement les éléments les plus résistants.

B. — Détermination du nombre des microbes « vivants » par examen microscopique.

1^{re} ÉVALUATION DU NOMBRE DES MICROBES VIVANTS PAR EXAMEN MORPHOLOGIQUE. — En 1921, HANS HECKSCHER (97) proposa de dénombrer séparément les microbes capables de proliférer en se basant sur l'allongement que ces bactéries présentent avant de se multiplier. « Dans un milieu liquide, ensemencé de bacilles appartenant à une des espèces suivantes : bacille coli, bacilles typhiques et paratyphiques A et B, bacille pyocya-

nique et d'autres encore, les premières heures de culture n'apportent aucune augmentation du nombre des microbes, mais seulement un changement dans leur morphologie : chaque germe, capable de proliférer, se développe en un long bâtonnet, dont la forme contraste fortement avec celle des bacilles incapables de prolifération et qui ne se transforment pas. A l'aide de numérations différentielles faites au microscope, il est donc possible de connaître quel est le nombre des bacilles ensemencés qui proliféreront dans les conditions données de culture. » L'auteur danois proposa d'utiliser, pour cette opération, la méthode de numération microscopique qu'il avait proposée quelques mois auparavant.

Cette proposition est, en théorie, fort intéressante mais son application pratique ne semble pas très aisée. L'auteur lui-même, tout au moins dans l'article que nous avons sous les yeux (*C. R. Soc. Biol.*, 1921, '85, p. 612), ne donne aucun exemple de numération et constate qu'il est difficile de donner des précisions sur le moment où il convient de faire l'examen. En effet, en admettant que les microbes qui vont se diviser se distinguent facilement de ceux qui sont morts, il faut reconnaître qu'il n'est pas facile, en pratique, de choisir le moment favorable pour effectuer la numération. D'une part on a intérêt à attendre que les microbes « vivants » soient devenus aussi longs que possible et, d'autre part, on risque, en attendant trop longtemps, de laisser se produire la division cellulaire. Il semble même que l'idée qui a dirigé HANS HECKSCHER n'est pas tout à fait exacte. Pour cet auteur, si l'on s'en rapporte à la phrase citée plus haut, l'allongement des bacilles paraît se produire pendant la phase de latence. Or, si l'on examine les travaux de CLARK et RUEHL (40) en 1919, et de HENRICI (99) (101), on constate que l'allongement ne se produit pas pendant la phase de latence, mais qu'il commence au contraire avec la phase de multiplication logarithmique, c'est-à-dire vers la 4^e heure, pour cesser avec elle vers la 8^e ou la 10^e heure. Alors que HANS HECKSCHER voit seulement dans l'allongement d'un bacille les phénomènes précurseurs de la division, il semble que les autres auteurs y distinguent plutôt une phase caractéristique de la vie microbienne, un cycle de jeunesse correspondant à la période de multiplication accélérée. S'il en est ainsi, sans nier l'intérêt que présente le dénombrement des formes longues, il paraît évident que ces formes ne représentent pas, à elles seules, tous les microbes capables de se multiplier. Il peut exister, en dehors d'elles, des bacilles plus petits nés d'une division immédiatement antérieure ou ayant dépassé la période de l'allongement, et qui sont cependant capables de se diviser.

En outre, d'après CLARK et RUEHL (40), qui ont étudié de nombreuses espèces microbiennes, un certain nombre de bactéries, entre autres les bacilles diphtériques et le *Bacillus mallei*, ne présentent pas ce phénomène de l'allongement. Pour ces microbes la phase de multiplication logarithmique est au contraire caractérisée par l'existence d'éléments fort petits.

Pour toutes ces raisons, il nous semble difficile d'utiliser la technique de HANS HECKSCHER pour suivre l'évolution de la multiplication microbienne.

2° ÉVALUATION DU NOMBRE DES MICROBES VIVANTS PAR NUMÉRATION MICROSCOPIQUE APRÈS COLORATION ÉLECTIVE. — Il existe des colorants, qui se fixent avec intensité sur les microbes morts, mais qui ne colorent que très peu les bactéries vivantes. C'est sur cette propriété que repose la méthode dont nous allons parler. Des techniques analogues avaient déjà été utilisées en 1920 par MILLER (141) et BURGESS (32) et en 1921 par FRASER (68) et FULMER (76) pour différencier les levures vivantes des levures mortes, mais ce fut surtout HENRICI (100) qui, en 1923, appliqua ce procédé à la numération différentielle des microbes vivants et des microbes morts.

HENRICI utilisa, dans ce but, le principe de la méthode de BREED et BREW et la méthode de coloration négative de BEMANS. « Une quantité mesurée de suspension bactérienne est intimement mélangée avec une quantité égale de solution aqueuse de rouge Congo à 2 pour 100. Le mélange est laissé 10 minutes au repos. Après avoir agité de nouveau, on en prélève $0^{\text{cm}^3}_{01}$ avec une pipette capillaire et on dépose cette quantité d'émulsion sur une lame propre sur laquelle a été dessiné un carré de 2 centimètres de côté. Au moyen d'un fil de platine la goutte de liquide est étalée autant que possible sur cette surface. On laisse sécher et on plonge la lame dans une solution à 1 pour 100 d'acide chlorhydrique dans l'alcool à 95°. Le colorant devient bleu et la préparation se trouve fixée. On recouvre les lames ainsi préparées avec une couche d'huile de cèdre, ce qui permet de les conserver indéfiniment. Les cellules qui étaient vivantes au moment de la coloration ne sont pas colorées et apparaissent comme des taches blanches sur le fond bleu de la préparation. Il est intéressant de noter que cet espace clair reproduit fidèlement la taille et la forme des cellules vivantes, telles qu'elles se trouvaient dans l'émulsion bactérienne, alors que les cellules elles-mêmes peuvent diminuer considérablement de volume après dessiccation et fixation de la préparation. Les cellules qui étaient mortes au moment de la coloration apparaissent avec une coloration bleue distincte, en général plus foncée que le fond coloré. »

L'auteur a étudié, au moyen de cette technique, des suspensions microbiennes tuées de différentes manières. En opérant avec des émulsions bactériennes, tuées par la chaleur, il a constaté que la coloration n'apparaît pas immédiatement après la mort. Les corps bactériens ne se colorent avec intensité que plusieurs heures après le chauffage et la coloration est plus facile lorsque le chauffage a été effectué à 60° que lorsqu'il a été fait à 100°. Enfin tandis que des microbes tués par le formol ne se colorent pas, des bactéries naturellement mortes puis conservées dans le formol gardent la propriété de se colorer. HENRICI estime donc que la faculté de prendre intensément le colorant n'est pas due à la mort même des cel-

lules, mais qu'on doit l'attribuer à un début d'autolyse. Si l'on tient compte de ces constatations, on remarque que la méthode de HENRICI perd un peu de sa netteté puisque ce ne sont pas les microbes morts qui sont fortement teints mais seulement ceux qui ont subi un début d'autolyse. Il est donc à craindre que cette méthode donne dans certains cas, par exemple dans l'étude des antiseptiques, des résultats inutilisables.

L'auteur a également remarqué que les granules métachromatiques des bacilles diphtéroïdes, ou que les granulations, peut-être assimilables à des spores, de certains bacilles sont colorés par le rouge Congo, même dans les cellules vivantes. Il pense donc que la différenciation des cellules vivantes et des cellules mortes ne peut pas être attribuée à des changements dans la perméabilité de la membrane cellulaire. Constatant en outre que le colorant n'imprègne pas seulement le protoplasme des bactéries mortes, mais qu'il se concentre également sur la lame autour de ces cellules, l'auteur émet l'hypothèse que la coloration peut être expliquée par une variation de la charge électrique des cellules.

On voit donc tout l'intérêt que présentent les travaux de HENRICI. Cependant la méthode de cet auteur, proposée depuis peu de temps, n'a pas encore fait ses preuves. De plus nous avons vu que, dans certains cas, elle peut, d'après l'auteur lui-même, donner des résultats discutables. Aussi, pour nos travaux personnels, nous avons préféré effectuer la numération des microbes vivants au moyen desensemencements sur plaque de gélose. Ce procédé classique, dont nous connaissons les avantages et les inconvénients, avait de plus l'avantage de nous donner des résultats comparables à ceux des autres auteurs.

III. — MÉTHODES BASÉES SUR L'ACTIVITÉ BIOCHIMIQUE DES BACTÉRIES

Dans un milieu de culture l'activité biochimique des bactéries se traduit soit par la disparition de substances alimentaires, soit par l'élaboration de produits de déchets. Si nous pouvons suivre exactement la diminution ou l'augmentation, au sein de ce même milieu, de certains principes définis, nous pourrions en déduire des indications sur la marche du développement microbien.

Les méthodes basées sur ce principe sont relativement peu nombreuses. Elles se sont surtout adressées à la fermentation alcoolique et à la fermentation lactique.

Dès 1882, P. REGNARD (159) présenta un appareil destiné à enregistrer les dégagements gazeux produits pendant la fermentation alcoolique.

Après lui, d'autres auteurs BIERNACKI (22) en 1891, H. SCHULTZ (170) en 1907, SLATOR (178) en 1913, ABDERHALDEN (1) en 1915, etc... mesurèrent l'activité d'une levure par le dégagement du gaz carbonique produit par la fermentation.

W. HESSE (105), en 1893, appliqua ces méthodes à l'étude de la production des gaz par différents microbes.

Enfin, en 1908, H. LUHQ et A. SARTORI (130) suivirent la marche de la fermentation alcoolique en notant les variations de la déviation polarimétrique produites par la consommation du glucose.

Pour la fermentation lactique, au contraire, les auteurs s'appliquèrent à titrer l'acidité formée.

NAEGELI et SCHWENDENER (147), puis CHARLES RICHET (163) et ses collaborateurs : CHASSEVANT, H. CARDOT (34) et E. BACHRACH (9) ainsi que d'autres auteurs procédèrent au dosage de l'acide lactique produit pour étudier, quantitativement, la poussée des bacilles lactiques et l'influence, sur cette multiplication, de divers antiseptiques agissant à des doses et à des températures variables.

En 1902, DUCLAUX (56), dans son *Traité de Microbiologie*, indiqua même que la transformation du lactose en acide lactique inactif s'effectuait, en fonction du temps, suivant une loi logarithmique.

Un peu plus tard, MICHAËLIS et MARCORA (139) substituèrent au titrage acidimétrique la mesure du pH pour l'étude de la multiplication du colibacille.

Diverses techniques, utilisées dans la bactériologie du sol pour la détermination de l'ammonification, de la nitrification et de la fixation de l'azote, peuvent se rattacher à ces méthodes. Enfin, dans quelques cas, on pourrait peut-être suivre le développement microbien en mesurant la quantité de chaleur dégagée par une culture ou la quantité de lumière produite par des bactéries luminescentes.

Du point de vue qui nous occupe, nous pouvons faire à propos de ces méthodes un certain nombre de remarques. Ces procédés ne sont utilisables que pour un très petit nombre de micro-organismes. L'insuffisance de nos connaissances sur la biochimie microbienne ne permet pas de les généraliser, et en particulier de les appliquer à l'étude des microbes saprophytes ou pathogènes qu'on rencontre habituellement dans nos laboratoires. On ne peut pas dire non plus, sans de sérieuses recherches, qu'il existe une proportion exacte entre le nombre des éléments microbiens et les changements apportés à la composition du milieu. Les modifications chimiques sont en effet produites par l'action de différentes diastases, or celles-ci continuent probablement à agir après l'arrêt de la multiplication microbienne et même après la mort des cellules qui les ont élaborées.

On ne sait donc pas si les modifications observées correspondent à la totalité des éléments microbiens ou seulement à l'ensemble des bactéries vivantes. Nous verrons d'ailleurs plus loin, quand nous étudierons les modifications apportées par la multiplication bactérienne à la composition chimique des milieux de culture, que, quand les microbes meurent, les diastases sécrétées continuent à agir et à provoquer la disparition de l'azote aminé et la formation de l'azote ammoniacal.

IV. — MÉTHODES PERSONNELLES UTILISÉES POUR L'ÉTUDE DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE DANS UN MILIEU LIQUIDE

Nous avons voulu suivre l'évolution d'une multiplication microbienne depuis l'ensemencement jusqu'à la mort des individus. Pour cela nous avons fait, pendant la durée de la culture, toute une série de prélèvements successifs et, dans chacun de ceux-ci, nous avons compté, d'une part tous les microbes visibles (microbes vivants et microbes morts), d'autre part tous les microbes capables de se multiplier sur plaque de gélose (microbes « vivants »). En effet tous les auteurs qui nous ont précédé, sauf BARBER (10) et HEHEWERTH (98), ont utilisé des méthodes de numération par ensemencement. Pour pouvoir comparer nos résultats aux leurs nous étions dans l'obligation d'utiliser une méthode analogue. Mais, comme nous l'avons déjà dit, cette technique nous paraissait insuffisante. Non seulement elle laisse de côté toute une catégorie de bactéries qui, cependant capables de se multiplier dans leur milieu liquide originel, ne sont pas assez résistantes pour se développer sur un milieu neuf solidifié, mais le nombre total des microbes est fort intéressant par lui-même. En effet les endotoxines et les diastases, qui jouent un rôle considérable dans la biologie microbienne, subsistent un certain temps après la mort des bactéries ou après la perte de leur pouvoir reproducteur. Nous avons donc pensé qu'il nous serait utile de connaître, en même temps, le nombre total des microbes visibles et nous avons utilisé pour cela une méthode de numération comparative dérivée de la méthode de WRIGHT. Dans l'exposé que nous venons de faire, nous avons indiqué les avantages et les inconvénients des différents procédés de numération utilisés jusqu'ici. Nous n'y reviendrons pas et nous donnerons simplement ici les techniques que nous avons employées pour nos recherches personnelles.

1° NUMÉRATION DES MICROBES CAPABLES DE SE MULTIPLIER SUR BOUILLON GÉLOSÉ. — Le bouillon gélosé utilisé est constitué par du bouillon à l'extrait de viande LIEBIG gélosé à 30 pour 1 000. Nous en indiquerons, plus loin, la préparation. Ce milieu est réparti dans des tubes à essai de 16 millimètres de diamètre à raison de 13 centimètres cubes environ par tube. Cette quantité est suffisante pour recouvrir le fond d'une boîte de PETRI d'une couche de gélose de quelques millimètres d'épaisseur. Avant de faire le prélèvement, on place 3 ou 4 de ces tubes dans un bain-marie, on porte l'eau à l'ébullition de façon à amener la liquéfaction de la gélose et on laisse refroidir jusqu'à 46° environ. On maintient alors le contenu du bain-marie à cette température et la gélose, restée en surfusion, est prête à être ensemencée.

Les dilutions sont effectuées dans une solution de chlorure de sodium

à 8 pour 1 000 dans l'eau distillée. Celle-ci est répartie, à la pipette, par fractions de 9 centimètres cubes dans des tubes à essai de 18 millimètres de diamètre et par fractions de 100 centimètres cubes dans des fioles coniques de 250 centimètres cubes. On ajoute dans chaque récipient une quantité convenable de billes de verre et on stérilise à 115° pendant 20 minutes. Pendant l'agitation, le choc des billes de verre provoque assez souvent la rupture des récipients en verre ordinaire, on aura donc avantage à employer, pour cet usage, des tubes et des fioles en pyrex qui sont beaucoup plus résistants.

Il est facile de compter, à l'œil nu, pour chaque boîte de PETRI, jusqu'à 300 ou 400 colonies. Comme onensemence chaque boîte avec 1 centimètre cube de liquide, il sera préférable, pour avoir de bons résultats, d'étendre suffisamment le liquide à examiner de façon à obtenir une dilution finale renfermant de 50 à 300 germes « vivants » par centimètre cube. Ces limites ne sont pas absolues et les résultats sont acceptables quand le nombre des colonies reste compris entre 10 et 500 ou 600 par boîte. Au-dessus de ce chiffre les numérations sont encore exactes, mais elles deviennent plus lentes et assez pénibles. Cependant, dans quelques cas, nous avons pu compter, à l'œil nu, plus de 2 000 colonies par boîte de PETRI.

Au premier abord il semble assez difficile de pouvoir préciser, par avance, la dilution à employer. Pourtant, en tenant compte du nombre des germes ensemencés, de l'âge de la culture, de la nature du milieu utilisé, des chiffres donnés par un prélèvement antérieur, quand cela est possible, et en se rapportant aux résultats fournis par d'autres expériences, on arrive à obtenir une approximation suffisante. De plus, nous avons vu que les limites entre lesquelles doivent osciller nos ensemencements sont assez larges, aussi, pratiquement, avec un peu d'habitude, on obtient toujours des résultats utilisables.

Voyons maintenant comment nous allons opérer. Le liquide à examiner, culture ou suspension microbienne, est rendu parfaitement homogène par des agitations vives et répétées en présence de billes de verre. A l'aide d'une pipette graduée stérile, on en prélève 1 centimètre cube et on porte cette petite fraction dans une première fiole renfermant 100 centimètres cubes de sérum physiologique. On agite vivement à plusieurs reprises et on obtient ainsi une première dilution à 1/100 du liquide à étudier. En prélevant à nouveau, au moyen d'une nouvelle pipette stérile, 1 centimètre cube de cette première dilution et en le portant dans une seconde fiole de sérum physiologique, on obtient une seconde dilution à 1/10 000. Enfin en répétant la même opération une troisième, puis une quatrième fois, nous aurons à notre disposition une troisième dilution à 1/1 000 000 et une quatrième dilution à 1/100 000 000. Dans tous nos essais nous n'avons jamais eu besoin d'utiliser une dilution plus étendue que cette dernière. Si, au lieu d'employer pour faire la première dilution 100 centimètres cubes de sérum physiologique, on utilise pour cela un tube contenant 9 centimètres cubes d'eau salée, la solution obtenue n'est plus que à 1/10

et donnera naissance, par les procédés habituels, à des dilutions à $1/1\,000$, $1/100\,000$ et $1/10\,000\,000$. Nous pourrons donc préparer ainsi la dilution qui nous semble le plus convenable. Une fois en possession de celle-ci, on en prélève 1 centimètre cube qu'on porte dans un tube de gélose liquéfiée et maintenue à 46° . On roule vivement le tube entre les mains pour en homogénéiser le contenu, et on coule dans une boîte de PETRI. On répète la même opération pour deux autres tubes et, après refroidissement, on porte les boîtes à l'étuve à 37° , couvercle en dessous.

Il est bien évident que, dans toutes ces opérations, on aura soin de bien agiter les dilutions au moment de les utiliser et d'opérer avec toutes les précautions en usage dans les laboratoires de bactériologie.

La numération des colonies peut se faire dès la 48^{e} heure. Nous avons vérifié que leur nombre n'augmente pas par la suite. Cependant nous préférons attendre jusqu'au troisième jour. Les colonies développées à l'intérieur de la gélose sont alors un peu plus grosses et plus faciles à distinguer. Pour faciliter la numération on pourra, au moyen de traits faits à l'encre, diviser le fond des boîtes en un certain nombre de secteurs. Ceux-ci seront d'autant plus petits que l'ensemencement sera plus riche. On comptera séparément les colonies renfermées dans chacun des espaces ainsi délimités, et on fera la somme des nombres obtenus. On évaluera de cette façon le nombre des colonies qui se sont développées dans les 3 boîtes ensemencées avec la même dilution. On fera la moyenne des résultats trouvés et, en multipliant ce nombre par le titre de la dilution ayant servi à faire l'ensemencement, on aura le nombre de microbes capables de se multiplier sur gélose contenus dans 1 centimètre cube du liquide à examiner.

2° NUMÉRATION MICROSCOPIQUE COMPARATIVE DE LA TOTALITÉ DES ÉLÉMENTS MICROBIENS. — Dans une première série d'expériences, J. RÉGNIER et S. LAMBIN (160) avaient utilisé comme cellules témoins des hématies de lapin. Le sang, prélevé dans la veine marginale de l'oreille, était dilué avec un volume égal d'une solution de citrate de soude à 1,5 pour 100. Ce procédé donne de bons résultats lorsqu'on évalue des nombres élevés de bactéries (plus de 200 millions de germes par centimètre cube). Pour pouvoir étudier des suspensions beaucoup plus pauvres en bactéries, nous avons été amenés à remplacer les globules sanguins par des cellules de levure. Il était en effet impossible de diluer, sans coagulation, le liquide sanguin. Cette modification, dont l'idée revient à FRIES (70), nous a donné de fort bons résultats. Non seulement nous avons pu, grâce à elle, examiner des liquides peu chargés de microbes, mais nous avons réalisé, en outre, une notable économie de peine et de temps. Les suspensions de levure se conservent bien et la même émulsion peut servir à la numération d'un assez grand nombre de prélèvements. Nous devons cependant signaler que les cellules de levure se distinguent un peu moins nettement que les hématies des microbes que nous étudions. Sur les préparations

colorées suivant la technique de TRIBONDEAU, les levures apparaissent avec la même teinte que les bactéries. La numération est donc un peu plus pénible que lorsqu'on utilisait des hématies qui, dans ce cas, présentaient une différence de teinte fort sensible. Cependant les formes des levures sont si dissemblables de celles des bactéries qu'il est facile de séparer ces deux éléments.

La numération des microbes visibles comporte deux opérations distinctes : la préparation de l'émulsion de levure et la numération des bactéries.

a) *Préparation de l'émulsion de levure.* — Au début de nos essais nous préparions cette émulsion à partir d'une culture pure de *Saccharomyces cerevisiae* sur carotte ou sur gélose ordinaire. Il nous a semblé ensuite plus pratique d'utiliser directement la levure des boulangers.

Pour la facilité de nos numérations, nous avons employé, autant que possible, des émulsions renfermant de 200 à 250 millions de cellules par centimètre cube.

Pour les préparer, on prélève dans la masse constituée par la levure agglomérée de petits fragments dont l'ensemble occupe un volume égal à un ou deux centimètres cubes. On aura soin de choisir une levure fraîche et de rejeter les produits desséchés ou partiellement autolysés. On place ces fragments dans un mortier et on les émulsionne dans 100 centimètres cubes de sérum physiologique à 8 pour 1000. L'eau salée est ajoutée par petites portions qu'on décante au fur et à mesure dans une fiole conique en pyrex de 250 centimètres cubes. Lorsque tout le liquide est passé dans celle-ci, on ajoute 3 centimètres cubes de chloroforme, une assez grande quantité de billes de verre, on bouche au liège et on agite énergiquement pour dissocier les amas de cellules. Avec un peu d'habitude, et surtout en comparant avec une émulsion plus ancienne et déjà dénombrée, on peut se rendre compte si la suspension ainsi préparée se rapproche du titre cherché. Dans le cas où elle s'en écarte trop, il est facile d'y remédier par addition de sérum physiologique ou par addition d'une nouvelle quantité de levure.

Pour procéder à la numération de cette émulsion, on en prélève, après agitation, 1 centimètre cube qu'on porte dans un des tubes en pyrex renfermant 9 centimètres cubes de sérum physiologique. On agite et c'est sur cette dilution à 1/10 qu'on effectue une numération hématimétrique ordinaire. Avec l'hématimètre de MALASSEZ il est bon de compter les cellules déposées sur 4 rectangles composés chacun de 20 petits carrés, chaque rectangle correspondant à un volume égal à 1/100 de millimètre cube. On répètera la même opération le lendemain et on prendra la moyenne des nombres trouvés. Le chiffre obtenu représente, en millions, le nombre de cellules de levure contenues dans 1 centimètre cube de l'émulsion examinée.

En effet, comme nous l'avons déjà dit, chaque rectangle représente 1/100 de millimètre cube et nous effectuons notre numération sur une dilution à 1/10 de l'émulsion primitive.

A titre d'exemple nous rapportons ici les résultats donnés par une opération. Pour les deux premiers rectangles nous indiquons, en outre, les chiffres obtenus pour tous les carrés.

1 ^{er} rectangle :	14	8	9	15
	12	11	11	9
	13	13	10	16
	6	17	20	10
	12	7	14	15
	57	56	64	65 = 242

2 ^e rectangle :	12	11	14	9
	15	15	10	11
	7	21	14	14
	16	6	12	21
	17	11	10	20
	67	64	60	75 = 266

3^e au 8^e rectangle = 255, 241, 294, 258, 271, 284.

Moyenne de tous ces nombres = $\frac{2111}{8}$ = sensiblement 264.

L'émulsion examinée renferme 264 000 000 de cellules par centimètre cube.

b) *Numération des bactéries.* — On commence par rendre bien homogène l'émulsion de levure et la suspension microbienne à examiner. On porte ensuite 1 centimètre cube de chacun de ces liquides dans un tube vide en pyrex renfermant déjà 5 à 6 billes de verre, et on mélange le tout en agitant fortement. Au moyen d'une pipette Pasteur, pas trop fine, on dépose alors une goutte du mélange sur 4 lames de verre, soigneusement lavées au mélange sulfo-chromique, puis passées à l'alcool ammoniacal. On étale alors ces gouttes à l'aide d'une pipette Pasteur assez souple ou d'une anse de platine, en ayant soin de s'arrêter avant la dessiccation complète. La préparation est alors séchée par agitation à l'air et on la colore suivant la technique de TRIBONDEAU. Ce procédé présente l'avantage de réaliser à la fois la fixation et la coloration de l'étalement et de ne nécessiter qu'un lavage terminal. On effectuera celui-ci avec beaucoup de précautions pour ne pas risquer d'entraîner, avec les eaux de lavage, des bactéries ou des levures. Il ne reste plus qu'à procéder à la numération comparative de ces deux sortes d'éléments en examinant pour cela un grand nombre de champs (au moins 50 et de préférence 100 ou un nombre supérieur). Ces champs sont pris sur les trois lames qui présentent les étalements les plus réguliers et les mieux colorés, on aura également soin de les choisir dans les différentes régions de ces lames. La numération est faite à l'aide d'un objectif à immersion et, si cela est possible, d'un oculaire quadrillé, elle peut être terminée en 60 ou 80 minutes. On fait alors d'une part la somme des bactéries et d'autre part la somme des levures observées. Le nombre de microbes contenus dans 1 centimètre cube du liquide à examiner est obtenu en multipliant le titre de l'émulsion de levure par

le nombre des microbes trouvés et en divisant par le nombre des levures.

Il est préférable de ne pas avoir une trop grande disproportion entre le nombre des microbes et celui des cellules de levure ce qui oblige à compter un très grand nombre de champs pour avoir un résultat valable. On aura donc avantage à étendre avant de l'examiner une suspension bactérienne trop riche. On tiendra compte de la dilution utilisée dans le calcul des résultats. Dans nos essais nous avons toujours dilué à 1/10 dans du sérum physiologique nos cultures âgées de plus de 24 heures.

Dans le troisième chapitre nous donnerons des exemples numériques de nos deux procédés de numération.

CHAPITRE II

ÉTUDE NUMÉRIQUE DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE

Les premières études numériques de la multiplication microbienne se rapportent à l'analyse bactériologique des eaux.

Dès 1885, CRAMER (48) étudia les variations du nombre des germes microbiens dans un échantillon d'eau du lac de Zurich conservé pendant 70 jours. Des prélèvements successifs lui donnèrent les chiffres suivants, qui indiquent le nombre de germes contenus dans 1 centimètre cube : au temps 0 : 143 ; après 1 jour : 12 457 ; après 3 jours : 328 543 ; après 8 jours : 233 452 ; après 17 jours : 17 436 ; au bout de 70 jours : 2 500.

Un an plus tard LEONE (123) obtint des résultats analogues en examinant une eau courante conservée en flacon, sans addition de substance étrangère.

En 1887 et pendant les années suivantes, MIQUEL (143) (144) dans les mêmes conditions (mise en bouteille et température de 29 à 30°), étudia l'évolution bactérienne dans les eaux de la Vanne et de la Dhuis. Il constata que pendant les premiers jours il se faisait une multiplication microbienne rapide et que le nombre des bactéries, qui était de quelques dizaines au moment du prélèvement, atteignait des chiffres voisins de un ou plusieurs millions. Il observa également que le nombre des microbes diminuait par la suite, mais que cette dernière phase était moins rapide que la première.

En 1895, FULLER (75) dans des essais analogues, remarqua qu'une eau d'étang, qui au moment du prélèvement renfermait 1 190 000 bactéries par centimètre cube, n'en contenait plus que 1 085 000 au bout de 2 heures. Ce nombre s'élevait ensuite à 23 000 000 au bout de 24 heures pour retomber à 2 341 000 après 8 jours.

Ces résultats furent confirmés par WHIPPLE (189) en 1901. FOKKER (66), dans une étude numérique des bactéries du lait, avait déjà apporté des observations semblables.

Tous ces essais concernaient des milieux très peu nutritifs,ensemencés avec des germes variés et conservés à des températures plus ou moins

bien définies. Les auteurs suivants, au contraire, entreprirent l'étude de la multiplication microbienne en employant pour cela les techniques normalement utilisées dans les laboratoires de bactériologie.

TRAVAUX ESSENTIELS RELATIFS A L'ÉTUDE NUMÉRIQUE DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE

Dès 1887, H. BÜCHNER, K. LONGARD et J. RIEDLIN (31), cherchèrent à se rendre compte de la rapidité de propagation d'une infection, en étudiant par la méthode des ensemencements sur plaque de gélose, la multiplication du vibron cholérique dans un bouillon nutritif. Pour que la composition du milieu reste toujours très favorable à la vie microbienne, ils n'enseménçaient qu'un petit nombre de bactéries (quelques centaines par centimètre cube), et ils arrêtaient l'expérience après un séjour relativement court à l'étuve à 37° (2 à 5 heures). En comparant alors le nombre des microbes présents à la fin de la culture au nombre des microbes ensemencés, et en tenant compte de la durée de l'expérience, ils calculaient le temps nécessaire à la formation d'une génération bactérienne. BÜCHNER et ses collaborateurs établirent pour cela le raisonnement suivant. Une cellule microbienne se multiplie par scissiparité, c'est-à-dire qu'elle se partage en deux nouvelles cellules. Connaissant le nombre des microbes au début et à la fin d'une expérience il est donc possible de calculer le nombre de bipartitions produites dans un temps donné et, par suite, de déterminer la durée d'une bipartition, c'est-à-dire le temps nécessaire à la formation d'une génération.

Calculons, par exemple, le nombre de bipartitions produites dans une période de 5 heures. Désignons par a le nombre des microbes ensemencés, par b le nombre des microbes à la fin de l'expérience, et soit x le nombre de bipartitions cherché.

Après 1 bipartition nous avons eu $a \times 2$ microbes, après 2 bipartitions nous avons $a \times 2 \times 2$ ou $a \times 2^2$ microbes,... après x bipartitions nous devons avoir $a \times 2^x$ microbes. Or l'expérience nous a donné la valeur de $a \times 2^x$, ce nombre est précisément égal à b .

Nous pouvons donc écrire $a \times 2^x = b$ ou $2^x = \frac{b}{a}$ par suite

$$\log. 2^x = \log \frac{b}{a} \text{ ou } \log 2^x = \log b - \log a$$

$$\text{et } x = \frac{\log b - \log a}{\log 2}.$$

Comme ces x bipartitions se sont produites en 5 heures, c'est-à-dire en 300 minutes, nous pouvons dire que la durée moyenne d'une bipartition, pendant la période considérée, s'exprime par la relation

$$\text{temps de génération } g = \frac{300}{x} \text{ en minutes.}$$

En calculant, à l'aide de ces formules, le temps de génération du vibron cholérique, les auteurs allemands trouvèrent des chiffres compris entre 19,3 et 40. Ils attribuèrent ces variations au fait que les souches ensemencées étaient dissemblables.

En 1895, MAX MÜLLER (146) voulut rechercher si les températures fébriles exerçaient une influence défavorable sur la multiplication des bactéries. Il compara pour cela les vitesses de multiplication du bacille typhique à 40° (température fébrile) et à 37° (température normale). MÜLLER utilisa pour faire ses essais la méthode de numération par ensemencement sur plaques de gélose mais, au lieu de se borner à dénombrer les microbes seulement au début et à la fin de l'expérience, il eut l'idée de suivre l'évolution de la multiplication microbienne par des prélèvements plus fréquents. En prolongeant ses expériences pendant une douzaine d'heures, et en effectuant des numérations à peu près toutes les 3 heures, il constata ce fait inattendu que dans les 2 ou 3 premières heures de la culture il n'y avait aucune multiplication bactérienne. L'auteur attribua d'abord ce phénomène au fait que la souche destinée à être ensemencée dans du bouillon simple était entretenue sur bouillon gélosé. La phase d'attente correspondrait donc à une accommodation du microbe à un nouveau milieu. Cependant, constatant que même en repiquant dans un bouillon des microbes provenant de ce même milieu cette phase de latence subsistait, MÜLLER attribua ce retard à une sorte d'altération subie par les microbes dans le milieu souche. Les bactéries ainsi modifiées, transportées dans un nouveau liquide, auraient besoin d'un certain temps de repos avant de se multiplier. Pour vérifier si cette supposition était exacte, il utilisa des souches d'âges divers mais de préférence très jeunes. Il montra ainsi que des souches très récentes (2 h. 1/2, 2 h. 3/4, 3 h.), repiquées sur du bouillon frais, conduisaient à des durées de génération nettement plus courtes que des cultures plus âgées (14 heures, 16 heures et au-dessus) ensemencées dans les mêmes conditions. La durée de la période de latence diminue donc, et a même tendance à disparaître, quand on effectue les essais à partir de souches très jeunes, vieilles seulement de quelques heures.

Quoi qu'il en soit, d'après MÜLLER, quand on effectue des repiquages en bouillon à partir de cultures âgées d'un ou de deux jours, on constate, dans le développement microbien, l'existence de trois stades différents :

- 1° une période de non-propagation, qui dure au maximum 3 ou 4 heures et dépend de l'âge de la culture souche ;
- 2° une période pendant laquelle les générations se succèdent avec une rapidité assez uniforme ;
- 3° une période au cours de laquelle la multiplication s'effectue de plus en plus lentement et finalement s'arrête.

Reprenant les résultats donnés par BÜCHNER, l'auteur montra que les variations observées étaient dues à des différences dans la durée des expériences. Dans le calcul du temps de génération, la période de latence

avait une influence d'autant plus grande que la durée de l'essai était plus brève. En examinant les chiffres de BÜCHNER, on remarque en effet que les grandes valeurs trouvées pour le temps de génération correspondent à une durée d'essai réduite (2 heures), tandis que les petites valeurs ont été fournies par des expériences plus prolongées.

Enfin, revenant au problème qu'il s'était posé au début de ses recherches, MÜLLER montra que la durée d'une bipartition du bacille typhique augmentait de 5 minutes environ lorsque la température passait de 37° ou 38° à 40°. La multiplication n'était entravée que pour une température de 44°,5. Contrairement à ce que prétendaient d'autres auteurs, les températures fébriles ne sont donc pas capables d'arrêter le développement du bacille typhique.

En résumé, les travaux de BÜCHNER et de ses élèves, et ceux de MÜLLER contiennent toutes les données théoriques essentielles relatives à la multiplication microbienne. Les essais des auteurs suivants ne feront qu'apporter des détails complémentaires à ces données primordiales. Nous les examinerons au fur et à mesure que nous passerons en revue les différentes phases du développement microbien. Nous devons cependant faire remarquer, tout de suite, que presque tous les auteurs ont suivi la multiplication microbienne en employant, pour la numération des bactéries, la méthode des ensemencements sur plaque de gélose ou de gélatine. Seuls HENEWERTH (98), WILSON (190) et surtout BARBER (10) utilisèrent des techniques différentes. Les deux premiers procédaient, à la fois, à la numération microscopique de tous les germes visibles et à celle des bactéries capables de se multiplier sur milieu solidifié. BARBER, en 1908, partait d'une bactérie unique qu'il ensemençait, à l'aide de pipettes capillaires, dans une goutte pendante de bouillon renfermée dans une lame-cellule. Il pouvait ainsi choisir un organisme d'aspect normal et suivre, directement au microscope, la multiplication microbienne pendant un nombre considérable de générations. Il notait en même temps la forme et la mobilité des microbes examinés et il obtint ainsi des résultats extrêmement intéressants.

ÉTUDE PARTICULIÈRE DES DIFFÉRENTES PHASES DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE

Si l'on ensemence dans un milieu de culture convenable des micro-organismes provenant de cultures âgées par exemple de 24 heures, et si l'on suit, comme l'ont fait tous les auteurs sauf BARBER, la multiplication bactérienne par numération des colonies poussant sur plaques de bouillons gélatinés ou gélosés, on constate les faits suivants :

Pendant un certain temps il n'y a pas d'accroissement apparent du nombre des microbes, la multiplication commence ensuite et les nombres grandissent, d'abord lentement, puis de plus en plus rapidement, jusqu'à ce que les cellules se divisent avec une vitesse uniforme. Au bout d'un

certain nombre d'heures les conditions deviennent défavorables, la vitesse avec laquelle se multiplient les cellules diminue et finalement la poussée cesse entièrement. Les microorganismes présents restent en nombre constant pendant un temps plus ou moins court, puis les cellules commencent à mourir. Si l'on prolonge l'observation on constate que toutes les bactéries finissent par disparaître ou qu'il n'en subsiste qu'un nombre relativement petit.

On peut donc distinguer dans la poussée microbienne différentes phases qui, suivant l'organisme et les conditions de la culture, pourront être plus ou moins longues ou même empiéter les unes sur les autres. Ces phases, étudiées particulièrement par HEHEWERTH (98), JANET E. LANE CLAYTON (41), MISS H. CHICK (38), PENFOLD (151), ALAN M. CHESNEY (37), CLARK et RUEHL (40), GRAHAM SMITH (181), BUCHANAN (28) (30), WINSLOW (191), etc., peuvent être désignées de la façon suivante :

- 1° Phase de latence ;
- 2° Phase de multiplication constante et rapide, dite phase de multiplication géométrique ou phase de multiplication logarithmique ;
- 3° Phase de multiplication ralentie ;
- 4° Phase de maximum stationnaire ;
- 5° Phase de destruction des bactéries.

Certains auteurs, tels que WINSLOW (191), étudiant plus spécialement les variations des populations bactériennes dans des milieux naturels comme le sol, les eaux, etc..., préfèrent les dénominations suivantes :

- 1° Phase d'ajustement ;
 - 2° Phase d'accroissement ;
 - 3° et 4° Phase de crise ;
 - 5° Phase d'abaissement ;
- et distinguent en outre une dernière phase :
- 6° Phase de réajustement.

Ces différentes phases sont visibles sur les courbes de multiplication que nous publions au chapitre III. Nous allons maintenant les étudier plus complètement et montrer comment elles peuvent varier sous l'influence de différentes conditions : propriétés physico-chimiques ou composition du milieu de culture, nombre et qualité des microbesensemencés, température de la culture, etc... Nous chercherons également à expliquer leur raison d'être en utilisant pour cela les travaux des différents auteurs.

Certains auteurs, parmi lesquels MAC KENDRICK et PAÏ (111), puis ROBERTSON (165) et LOTKA (129), renonçant à voir dans les courbes de multiplication une succession de différentes phases, sont arrivés à cette conclusion que la forme sigmoïde des courbes des nombres exprime un phénomène voisin du phénomène de l'autocatalyse. Pour établir leur théorie, ces auteurs ont admis que la valeur de l'accroissement est constamment proportionnelle à la concentration des matières nutritives convenables ou à celle d'une seule de ces substances agissant comme un facteur seul. Ils ont ainsi calculé une courbe schématique, courbe en S symé-

trique et régulière, qui exprimerait théoriquement le phénomène autocatalytique. Des résultats, trouvés par eux dans l'étude numérique d'une poussée microbienne, se conformeraient à cette courbe autocatalytique. Comme le fait remarquer BUCHANAN (28), l'accord n'est pas toujours aussi bon et c'est en particulier le cas quand la phase de latence est un peu prolongée. D'autre part la multiplication microbienne peut fort bien ne pas être directement et simplement proportionnelle à la concentration des aliments convenables. D'autres facteurs (température, qualité et nombre des germesensemencés, propriétés du milieu de culture, etc...), peuvent altérer la forme de la courbe, la rendre par exemple nettement asymétrique, et par conséquent dissemblable d'une courbe autocatalytique.

D'après BUCHANAN la forme des courbes peut encore se compliquer. Certaines poussées microbiennes présenteraient plus d'une phase logarithmique, c'est ainsi que des cultures produisant du gaz carbonique pourraient être en même temps stimulées par ce gaz. Un petit ensemencement, effectué à la phase logarithmique, montrerait alors, pendant un certain temps, une valeur constante de poussée. Plus tard, la production de gaz carbonique produirait une action stimulante et le temps de génération diminuerait. Après saturation du gaz carbonique la valeur de la poussée redeviendrait constante et des phénomènes semblables pourraient recommencer. Sans discuter la possibilité théorique de tels phénomènes alternants, il nous paraît que des courbes de multiplication aussi compliquées doivent être plutôt rares. Pourtant on pourrait peut-être trouver dans ces faits une explication des résultats surprenants publiés par HEHEWERTH. En étudiant, par numération microscopique directe, le développement du colibacille en bouillon, cet auteur a trouvé que la multiplication pouvait se faire en deux phases rapides : l'une allant du début à la 10^e heure et l'autre s'étendant de la 25^e heure à la fin de la croissance (14^e jour).

A. — Phase de latence.

Cette phase a été mise en évidence pour la première fois, en 1895, d'une part par FÜLLER (75) dans des analyses d'eaux et d'autre part par MÜLLER dans les essais que nous avons rapportés plus haut. Elle s'étend depuis l'ensemencement jusqu'au moment où la multiplication des bactéries s'effectue avec une vitesse uniforme et rapide. Sa longueur varie avec les conditions de l'expérience. Dans la pratique courante (bouillon ordinaire, souche de 24 heures, ensemencement de plusieurs millions de germes, température d'incubation de 37°), la phase de latence se prolonge pendant 2 ou 3 heures.

En 1918, BUCHANAN (30) montra que la phase de latence peut être divisée en deux parties : une première phase initiale stationnaire pendant laquelle le nombre des bactéries reste constant, et une deuxième phase, présentant une accélération positive de croissance, au cours de laquelle les bactéries commencent à se diviser et accélèrent peu à peu leur vitesse

de multiplication. Ces deux parties ne se distinguent vraiment que dans la germination des spores. On doit cependant noter que certains auteurs, MYER COPLANS (43), LANE CLAYTON (41), PENFOLD (151), etc..., ont constaté qu'il y avait parfois, au début de la période de latence, diminution du nombre des microbes ensemencés. La subdivision établie par BUCHANAN aurait donc une certaine valeur même dans le cas de bacilles non sporulés. Nous allons maintenant passer en revue les différents facteurs qui exercent une influence sur la durée de la phase de latence, puis nous examinerons les différentes hypothèses qui ont été émises pour expliquer l'existence de cette période.

1° PRINCIPAUX FACTEURS QUI EXERCENT UNE INFLUENCE SUR LA DURÉE DE LA PHASE DE LATENCE. — La phase de latence est influencée particulièrement par la constitution des milieux de culture, la température d'incubation, l'espèce microbienne, l'âge des souches utilisées et le nombre des microbes ensemencés.

a) *Influence de la constitution des milieux de culture.* — Les premiers auteurs eurent tout naturellement l'idée que la phase de latence représentait le temps nécessaire au microbe ensemencé pour s'accoutumer à un nouveau milieu. MÜLLER (146), HEHEWERTH (98), MYER COPLANS (43), PENFOLD (151) recherchèrent donc ce que devenait cette période lorsqu'on repiquait un microbe dans un milieu auquel il était déjà accoutumé. Ils constatèrent que, dans ces conditions, le temps de latence diminuait mais ne disparaissait pas. Il n'en est pas moins vrai que la constitution du milieu a une certaine importance.

En 1910, MYER COPLANS (43) ensemença des colibacilles, provenant de cultures âgées de 14 heures et demie et ayant poussé à l'étuve à 20°, dans de l'eau peptonée salée et dans du bouillon dulcité. Il constata que la phase de latence existait dans les deux cas, malgré la jeunesse de la souche utilisée, mais qu'elle était beaucoup plus nette pour le bouillon dulcité. Dans ce dernier milieu on constatait même, aussitôt après l'ensemencement, une diminution du nombre des bacilles.

PENFOLD (151) montra également que, toutes choses égales d'ailleurs, on observait une latence plus grande lorsqu'on ensemencait en eau peptonée dulcité un colibacille provenant de ce même milieu, que lorsqu'on ensemencait en eau peptonée simple un colibacille déjà cultivé dans cette même eau peptonée simple.

La réaction du milieu joue également un certain rôle. BARNETT COHEN et MANSFIELD CLARK (42), en 1919, montrèrent que si l'on transporte des cellules d'un milieu neutre dans un milieu alcalin la phase de latence est augmentée. Ils notèrent également que, pour le colibacille cultivé en bouillon peptoné phosphaté, le début de la période d'accroissement maximum avait lieu au bout d'une durée de 2 à 4 heures pour un pH compris entre 6,1 et 8,1 ; au bout de 3 à 5 heures pour un pH inférieur à 5,5 ; et seulement après 10 à 12 heures pour un pH égal à 8,9.

SHERMAN (175), à la suite de ces auteurs, retrouva des faits sembla-

bles en étudiant également la multiplication du colibacille en bouillon.

Enfin la phase de latence peut parfois atteindre des valeurs considérables. D'après OTTO RAHN (157) une solution d'asparagine ensemencée avec du *Bacillus prodigiosus* resta 4 semaines visiblement stérile. A ce moment le bacille se mit brusquement à se multiplier en donnant naissance à la coloration rouge caractéristique. Nous retrouverons un fait analogue, mais beaucoup moins marqué, quand nous étudierons la croissance du bacille pyocyanique en milieux artificiels.

b) *Influence de la température d'incubation.* — HEHEWERTH (98) montra, dès le début de ses recherches, que la longueur de la phase de latence varie avec la température. Elle augmente quand la température s'abaisse. Ce fait, déjà signalé par WHIPPLE (189) pour les bactéries de l'eau conservée en bouteille, fut retrouvé par OTTO RAHN (157), JANET E. LANE CLAYPON (41), H. CHICK (38) et PENFOLD (151). Dans le cas du colibacille et du *Bacillus enteritidis* la phase de latence, d'après JANET LANE CLAYPON, passe de 1 heure à 6 heures lorsque la température décroît de 42° à 20°.

c) *Influence de l'espèce microbienne, de son état antérieur et des dommages que les bactéries ont pu subir.* — La latence varie avec l'espèce microbienne utilisée. Ce fait, déjà signalé par HEHEWERTH, a été confirmé par JANET LANE CLAYPON. Il peut arriver, exceptionnellement, que des spores ou de simple cellules végétatives présentent un développement extrêmement lent alors que toutes les conditions sont favorables. WINSLOW (191) cite des expériences de BURKE, SPRAGUE et BORNES démonstratives à cet égard. Ces auteurs ont ensemencé du bouillon et des tubes de gélose avec un très petit nombre de colibacilles. Tandis que 85 pour 100 des 473 tubes qui ont poussé l'ont fait en 2 jours et 97 pour 100 en 6 jours, il y a eu 10 tubes qui se sont développés seulement le 14^e jour, 4 le 15^e et 4 le 16^e. WINSLOW cite également des cas où, dans des conditions très favorables, des spores de *Bacillus Subtilis* sont restées en latence pendant 39 jours. On voit donc que, même à l'intérieur d'une culture, on peut trouver des individus de vitalités fort différentes. Peut-être faut-il admettre que les bactéries lentes ont subi quelque dommage, au moment de l'ensemencement par exemple. MYER COPLANS (43) a en effet montré que des microbes, altérés par une exposition prolongée au froid ou par l'action de faibles quantités d'antiseptiques, présentaient une phase de latence supérieure à celle des bactéries normales. Pour ALLEN (3) et d'autres auteurs, la poussée plus lente des bactéries du lait pasteurisé s'explique par le choc produit sur ces micro-organismes par l'action de la chaleur. Enfin ESTY et MEYER (63), étudiant des cultures de Bacille botulique plus ou moins chauffées, ont noté, dans certains cas, une phase de latence pouvant durer des jours et des semaines.

Nous verrons plus loin que ces phénomènes d'altération microbienne (injury) furent invoqués par certains auteurs, en particulier par CHESNEY, (37) pour expliquer l'existence même de la phase de latence.

d) *Influence de l'âge des microbes au moment de l'ensemencement.* — Dès ses premiers essais, MÜLLER (146) montra que des souches très jeunes présentaient des temps de latence nettement plus courts que des cultures plus âgées ensemencées dans les mêmes conditions. C'est ainsi que pour le bacille typhique, le temps de latence, qui était de 40 minutes pour une souche âgée de 2 à 3 heures, passait à 80 ou 85 minutes pour une souche de 6 heures, et atteignait finalement 160 minutes lorsqu'on s'adressait à une culture de 14 à 16 heures. Ces résultats furent confirmés par HEHEWERTH (98), OTTO RAHN (157), MYER COPLANS (43), PENFOLD (151) et ALAN M. CHESNEY (37) qui démontrèrent, de façon indiscutable, que la période de latence est d'autant plus marquée que les bactéries ensemencées sont plus vieilles. Cependant pour PENFOLD cette progression s'arrête à partir d'un certain âge de la culture et la latence est la même pour une souche de 4 jours que pour une souche de 12 jours.

BARBER (10), en suivant directement au microscope la multiplication d'un seul microbe, montra en outre que, quand on transportait une bactérie très jeune (bactérie de 2^e ou de 3^e génération) d'un milieu de culture dans un autre milieu identique, on ne retrouvait plus de période de latence. Cet auteur répéta ses expériences avec le colibacille, le bacille typhique et le *Bacillus Subtilis*. Dans tous les cas les bactéries se multipliaient immédiatement dans le nouveau liquide suivant une progression géométrique, le temps de génération minimum restant constant. Cette disparition de la phase de latence, quand on effectue les ensemencements avec des microbes très jeunes prélevés en pleine période de multiplication logarithmique (cultures âgées de 3 à 5 heures), fut ensuite retrouvée par MAC KENDRICK et PAI (111) en 1911, par PENFOLD (151) en 1914, et par ALAN M. CHESNEY (37) en 1916.

e) *Influence du nombre des microbes ensemencés.* — OTTO RAHN (157) trouva d'abord que la phase de latence était diminuée lorsqu'on ensemencait un grand nombre de germes. PENFOLD reprit les expériences de cet auteur mais il obtint des résultats différents. Il constata que dans le cas de larges ensemencements (quelques centaines de milliers de bactéries par centimètre cube), la grandeur de ceux-ci avait peu d'influence sur la latence. Dans le cas de petits ensemencements, au contraire, celle-ci paraissait plus marquée pour les ensemencements les plus faibles. Il publia par exemple les chiffres suivants, qui correspondent à des cultures faites dans les mêmes conditions :

Nombre de bactéries ensemencées par centimètre cube.	120	1010	2970	10875
Temps moyen de génération pendant la phase de latence (deux premières heures).	56 minutes	48	47	45
Temps moyen de génération pendant la troisième heure (fin de la période de latence et début de la phase logarithmique). . .	22 minutes	24,6	24	24

ROBERTSON (166), en étudiant la biologie des infusoires, avait déjà fait des constatations analogues. Il avait remarqué que la poussée de ces organismes était bien plus rapide quand ils étaient ensemencés en grand nombre que lorsqu'ils l'étaient en quantité plus restreinte. Ce phénomène de stimulation mutuelle a reçu le nom d'« allélocatalyse ». VALLEY et RETTGER (186) semblent également indiquer que de nombreux organismes poussent très lentement, ou même pas du tout, tant qu'une certaine concentration minima de gaz carbonique n'est pas atteinte. On comprendrait ainsi l'allongement de la phase de latence dans le cas de très faibles ensemencements.

2° HYPOTHÈSES ÉMISES PAR LES DIFFÉRENTS AUTEURS POUR EXPLIQUER L'EXISTENCE DE LA PHASE DE LATENCE. — L'existence d'une phase de latence étonna tout particulièrement les premiers auteurs, qui donnèrent à ce phénomène une importance considérable. Les hypothèses émises pour l'expliquer sont fort nombreuses et d'ailleurs peu convaincantes. Nous allons rappeler ici les plus importantes.

a) *Théorie de l'adaptation.* — C'est la première hypothèse, émise déjà par MÜLLER (146), d'après laquelle il fallait aux microbes un certain temps pour s'accoutumer à un nouveau milieu différent de leur milieu originel. Nous avons vu plus haut que MÜLLER lui-même avait montré l'inexactitude de cette supposition.

b) *Théorie de l'agglutination.* — Pour certains auteurs tels que Miss H. CHICK (38), il serait possible que les bactéries, réparties presque uniformément dans l'émulsion d'ensemencement, s'agglutinent dans les premières heures de leur contact avec le nouveau milieu. Chaque amas microbien ne donnerait ensuite naissance qu'à une seule colonie lorsqu'on utilise la méthode de numération par ensemencement sur plaque de gélose. Nous devons faire remarquer que les différents auteurs, qui ont utilisé cette méthode de numération, ont toujours pris les précautions nécessaires pour éviter cette cause d'erreur. De notre côté, en examinant, au microscope, les différents prélèvements effectués au cours de l'évolution d'une culture microbienne, nous n'avons pas remarqué, pour les milieux usuels, la présence d'amas microbiens plus nombreux pendant les premières heures de la culture. On rencontre bien parfois quelques bacilles agglomérés, mais ces amas sont relativement fort rares dans les milieux usuels et ne paraissent pas en rapport avec la phase de latence. La théorie de l'agglutination ne semble donc pas devoir être conservée, sauf peut-être quand la multiplication microbienne s'effectue dans des milieux spéciaux tels que le sérum sanguin ou le lait.

c) *Théorie de la sécrétion diastasique.* — Il pouvait être nécessaire qu'il y ait formation par les bactéries ensemencées de diastases, en quantité suffisante, pour fragmenter des molécules complexes, comme les protéines du bouillon, et rendre rapidement assimilables les substances nutritives.

d) *Théorie de la sécrétion accélérante subtoxique.* — Cette explication,

comme la précédente, a été proposée par OTTO RAHN (157). Pour déclencher la multiplication microbienne, il était peut-être nécessaire qu'il y ait mise en liberté, du fait même de la vie des bactéries, de petites quantités de substances toxiques. Ces substances, à doses très minimes, accéléreraient la division cellulaire.

Pour vérifier l'exactitude de l'une ou l'autre de ses hypothèses, OTTO RAHN ensemença des bactéries dans une solution nutritive ayant déjà servi à un début de multiplication microbienne avant d'être filtrée sur argile. Ce milieu devait donc se trouver tout préparé et aurait dû permettre une croissance rapide de ces mêmes bactéries. L'expérience montra qu'il n'en était rien et que la phase de latence existait encore dans le milieu ainsi modifié. RAHN fut donc amené à abandonner les hypothèses précédentes.

e) *Théorie de la nécessité de l'apport, par les bactéries ensemencées, d'une substance nécessaire à la multiplication.* — OTTO RAHN présenta enfin une troisième explication. Comme il avait constaté que la poussée microbienne était plus rapide lorsqu'on partait d'ensemencements abondants, il admit que les bactéries ensemencées agissaient sur la phase de latence par leur apport d'endoenzymes. Pour vérifier cette hypothèse il stérilisa des bouillons de culture, parvenus à leur plein stade de développement, par chauffage de 15 minutes à 70-75° ou par action du chloroforme ou de l'éther. Après évaporation des liquides volatils, il ensemença ces bouillons avec des cultures âgées de 24 heures et crut voir qu'il n'y avait plus de phase de latence. Cependant, comme cette absence de phase de latence persistait même après avoir porté le bouillon à l'ébullition, il renonça à cette nouvelle hypothèse, et il admit simplement que la phase de latence n'est vaincue qu'après apport puis production d'une quantité suffisante d'une substance favorable à la poussée microbienne. Cette substance, thermostable et non filtrable, est apportée puis produite par les bactéries elles-mêmes. OTTO RAHN se ralliait ainsi à la thèse soutenue par WILDIERS (bios) au sujet de la poussée des levures, et par ROBERTSON (allélocatalyse) à propos de la multiplication des infusoires.

BARBER (10) en réussissant à supprimer la phase de latence par simple repiquage d'une bactérie isolée a permis de mettre en doute la valeur de cette théorie. Si la multiplication bactérienne ne peut se produire qu'après l'apport d'une substance spéciale, celle-ci ne doit exister qu'en très faible quantité puisqu'un seul élément microbien en apporte suffisamment.

f) *Théorie de la division bactérienne.* — Pour BARBER les bactéries âgées, relativement courtes, doivent acquérir une longueur suffisante avant de pouvoir se diviser en deux nouvelles cellules filles. « Il est probable, disait-il, que quelque paroi transversale doit être formée avant que la séparation ait lieu. » Pour BARBER la phase de latence correspondrait donc au temps nécessaire à l'allongement des bactéries âgées. Au contraire les bactéries jeunes, plus longues, se divisent rapidement dès leur ensemencement.

g) *Théorie de l'altération des souches microbiennes.* — Cette hypo-

thèse, déjà envisagée par MÜLLER, a été soutenue par différents auteurs et en particulier par ALAN M. CHESNEY (37).

Pour ce dernier les produits du métabolisme microbien provoquent une altération de la cellule bactérienne. Cette altération produirait d'abord l'arrêt de la multiplication puis la mort des bactéries. Une bactérie ainsi lésée etensemencée dans un milieu neuf aurait besoin d'un certain délai pour reprendre son intégrité. Ce temps de réparation se traduirait par la phase de latence.

M. CHESNEY fait en outre remarquer qu'il faut tenir compte de cette notion d'altération microbienne lorsqu'on veut comprendre les variations de virulence des cultures, ou quand on étudie l'action des agents bactéricides. C'est ainsi que MISS H. CHICK (38) a montré que des bactéries âgées de 3 heures résistent mieux aux antiseptiques que des bactéries semblables provenant d'une culture de 18 heures.

h) Théorie de l'apport, par les bactéries, d'une certaine quantité de substance nuisible. — Cette hypothèse résulte des travaux de EIJKMAN (60). Il y aurait production, dans une culture microbienne, de substances inhibitrices, thermolabiles, qui provoqueraient d'abord l'arrêt de la multiplication bactérienne. Plus tard, à l'occasion d'une nouvelle culture, ces substances accompagneraient les bactériesensemencées et seraient responsables de la phase de latence. Pour vérifier cette hypothèse, PENFOLD (151) lava avec de l'eau salée ou du liquide de RINGER des cultures en eau peptonée âgées de 17 heures. En ensemençant les bactéries ainsi débarrassées des substances inhibitrices, on devait observer la disparition de la période de latence. L'expérience montra qu'il n'en était rien, et PENFOLD constata, que non seulement la phase de latence augmentait après lavage à l'eau salée des germes microbiens, mais qu'elle se prolongeait indéfiniment après lavage au RINGER. Cependant comme le contact d'une solution saline peut altérer les bactéries, les expériences de cet auteur perdent beaucoup de leur valeur. Enfin cette hypothèse, comme la précédente, est incapable d'expliquer pourquoi la phase de latence se produit dans un échantillon d'eau simplement conservé en bouteille.

i) Théorie de la sélection. — Pour PENFOLD (151) toutes les bactéries d'un même ensemenement ne présentent pas les mêmes possibilités de croissance. Au début de la poussée, on assisterait donc, sous l'influence d'un agent particulier contenu par exemple dans la peptone, à la sélection d'une souche poussant rapidement. Inversement, à la fin de la période logarithmique, il se ferait une autre sélection d'où résulteraient des conditions nouvelles capables de transmettre la latence aux subcultures. Ce qui semble confirmer cette hypothèse c'est que la phase de latence est diminuée lorsqu'on utilise comme souche une culture se trouvant à cette même période de développement, et qu'elle est annulée lorsqu'on effectue l'ensemencement avec une culture en pleine période logarithmique. Pourtant PENFOLD lui-même fit remarquer que, si cette supposition était exacte, on devrait trouver, dans le cas de faibles ensemenements, des valeurs de

croissance fort différentes, or l'expérience montre qu'il n'en est rien.

j) *Théorie de la synthèse par échelons des corps protoplasmiques.* — C'est la deuxième hypothèse de PENFOLD. Cet auteur fit remarquer que de nombreuses réactions chimiques ne se produisent qu'après une période d'induction due au fait que la réaction ne peut avoir lieu que par degrés. « Il est presque évident que si une substance C n'est pas produite directement par une substance A, mais qu'il faille passer par une substance intermédiaire B, la production maxima de C aura lieu, non pas au début de la réaction quand il n'y a pas de B, mais seulement lorsque B aura atteint sa concentration maximum. » Il est possible que la latence microbienne puisse être expliquée par une conception de cet ordre. On peut penser que certains des constituants du protoplasme bactérien sont synthétisés par échelons, peut-être grâce aux actions successives de différentes diastases. La croissance rapide coïnciderait alors avec la concentration optimum, dans la bactérie, de ces substances intermédiaires, et l'arrêt de la multiplication correspondrait au moment où ces substances tendent à diffuser ou à se détruire.

RETTGER (161), en 1918, reprit cette théorie et émit l'idée que la latence peut être diminuée, et même supprimée, en ajoutant aux milieux de culture des corps capables de remplacer les « corps intermédiaires » de PENFOLD. Ces substances seraient des amino-acides, des amines ou d'autres composés.

Il ne paraît pas que les hypothèses de PENFOLD soient absolument convaincantes. Nous devons encore ajouter que cet auteur, en collaboration avec LEDINGHAM (120), a établi des relations mathématiques se rapportant à la période de latence et à la phase logarithmique.

k) *Théorie de l'inertie.* — Suivant cette conception les bactéries ont à vaincre une « inertie » avant d'atteindre leur valeur maxima de multiplication. Nous ne voyons pas nettement ce qu'apporte de nouveau ce mot « inertie » substitué au mot « latence ». Remarquons pourtant que, d'après BUCHANAN (30), cette théorie est « à quelque égard, la meilleure proposée ».

l) *Théorie de la germination.* — C'est un fait bien connu qu'à des moments déterminés de la vie des plantes, certaines cellules ou certains tissus passent par une phase de repos. Ces organes, quand ils sont morphologiquement bien différenciés, prennent le nom de spores, sclérotés, semences, bulbes, tubercules, etc. Il est probable que dans de nombreux autres cas, et sans qu'il y ait de différenciation morphologique aussi visible, d'autres cellules ou d'autres tissus peuvent, sous l'influence de causes encore indéterminées, présenter un état de repos semblable. Celui-ci ne pourra cesser, vraisemblablement, qu'après passage dans un nouveau milieu et sous l'influence de certains stimulants. En transposant ces données dans le domaine bactériologique, nous devons admettre que les microbes que nous ensemençons ne sont plus des microbes ordinaires mais des formes « en repos ». La phase de latence ne serait plus que la période germinative. Cette hypothèse, soutenue par BUCHANAN (30), constitue

plutôt un rapprochement d'idée qu'un véritable essai d'explication.

Nous venons de passer en revue les principales hypothèses émises pour expliquer l'existence de la phase de latence. Leur nombre même nous montre, à lui seul, qu'elles sont toutes discutables. En fait, si nous nous en tenons aux travaux des auteurs étrangers, nous ne savons pas au juste pourquoi la phase de latence se produit ou ne se produit pas et pourquoi sa valeur varie avec les circonstances.

B. — Phase de multiplication logarithmique.

Cette phase, mise en évidence pour la première fois par MÜLLER (146), a encore été nommée phase de multiplication géométrique. En effet, pendant cette période la multiplication est géométriquement accélérée, et les microbes deviennent, dans le même laps de temps, toujours 2 fois plus nombreux. 2 donnent 4, qui donnent 8, qui deviennent 16, ... 32, ... 64, etc... Par suite si, sur un graphique, on porte en fonction des temps les logarithmes des nombres des microbes correspondants, on constate que, pendant cette période, les points ainsi obtenus se trouvent sur une droite. Le temps nécessaire pour qu'il y ait formation, par une simple bipartition des cellules bactériennes, d'un nombre double de microbes est appelé temps de génération. Il reste constant pendant toute la phase de multiplication logarithmique. Celle-ci, dans les conditions où l'on se place ordinairement, a une durée de 5 à 8 heures. D'après BARNETT COHEN et MANSFIELD CLARK (42) elle est comprise entre la 5^e et la 10^e heure de la culture.

Les recherches se rapportant à cette période sont beaucoup moins nombreuses que celles que nous venons d'examiner. Il est pourtant évident que nous avons ici le type même de la multiplication microbienne. WINSLOW (191) s'exprime de la façon suivante : « Il est facile de comprendre pourquoi les bactéries s'accroissent quand elles sontensemencées dans un milieu stérile et riche. Mais il est bien plus difficile d'expliquer pourquoi des bactéries, en équilibre plus ou moins stable dans l'eau d'une source, augmentent plusieurs milliers de fois en nombre simplement parce qu'une portion de l'eau dans laquelle elles vivaient est placée dans une bouteille fermée, sans qu'il y ait même aucun accroissement de température. » L'auteur, pour expliquer ce phénomène, avait pensé à une action stimulante des sels solubles provenant du récipient utilisé. On pourrait peut-être, maintenant, donner une explication plausible de cette multiplication en tenant compte du rôle possible du bactériophage.

Les éléments caractéristiques de la phase logarithmique (temps de génération et durée de cette période) nous renseignent sur la valeur d'un milieu de culture. Un milieu favorable doit permettre une multiplication microbienne rapide et prolongée. Le temps de génération minimum peut être maintenu constant en repiquant sans cesse, toujours dans le même milieu, des bactéries prélevées au cours de la phase logarithmique. Cette expé-

rience a été réalisée en particulier par BARBER (10). Dans une culture ordinaire, au contraire, les produits du métabolisme viennent rapidement entraver la division cellulaire. Pour une bactérie déterminée, le meilleur milieu sera donc celui qui, tout en fournissant le temps de génération minimum, permettra la plus longue multiplication microbienne.

Nous allons maintenant passer en revue quelques-uns des facteurs qui influent sur les différents caractères de la phase logarithmique.

a) *Influence de la constitution des milieux de culture.* — BARBER (10), en ensemencant des bactéries isolées, se plaça dans les conditions les plus favorables pour étudier la phase logarithmique. Il s'écoulait en effet un temps relativement long avant que la composition du milieu utilisé soit modifiée par le métabolisme microbien. En opérant dans ces conditions toutes spéciales, BARBER montra que la constitution des milieux de culture avait peu d'influence sur la multiplication du colibacille. « La suppression du sel ne donnait aucune diminution appréciable du temps de génération. L'addition de sucre ne donnait qu'une très petite différence. Les bouillons préparés avec de la viande fraîche, et employés immédiatement, ne donnaient pas de meilleurs résultats que les milieux conservés pendant quelque temps dans le froid avant leur utilisation. L'addition d'albumine humaine (sérum sanguin, extrait de muscle) était également sans influence.

Si nous sortons des conditions réalisées par cet auteur, nous constatons que la poussée microbienne peut être modifiée lorsqu'on fait varier la constitution des milieux de culture. HEHEWERTH (98) signala par exemple, qu'à 37° et dans du bouillon ordinaire, le temps de génération minimum était de 23 minutes pour le colibacille et de 33 minutes pour le bacille typhique. Quand on remplaçait le bouillon par un milieu moins favorable, comme l'eau peptonée salée, ce temps de génération atteignait 32 minutes pour le colibacille et 41 minutes pour le bacille typhique.

MISS H. CHICK (38), cultivant ces mêmes bacilles dans du sérum de lapin ou dans du sérum de chèvre, constata également que dans ces liquides peu favorables les temps de génération étaient augmentés.

De même PENFOLD et NORRIS (152) montrèrent que pour le bacille typhique, cultivé à 37° en milieux peptonés, le temps de génération minimum variait avec la richesse en peptone. Il augmentait régulièrement lorsque la teneur en peptone passait de 1 pour 100 à 0,4 et 0,2 pour 100. Inversement, si à un milieu renfermant 0,1 pour 100 de peptone on ajoutait 0,17 pour 100 de glucose, le temps de génération se trouvait diminué de moitié.

En 1919, BARNETT COHEN et MANSFIELD CLARK (42) étudièrent l'influence de la concentration en ions hydrogène sur les caractéristiques de la phase logarithmique. Ils trouvèrent par exemple que, pour la culture du colibacille en bouillon peptoné phosphaté, il existait une zone comprise entre pH 5 et pH 8, dans laquelle la vitesse de multiplication restait sensiblement constante. Au sortir de cette zone, le temps de génération augmen-

taient lentement au-dessus de pH 8 et brusquement au-dessous de pH 5. De plus ces auteurs reconnurent que la concentration en ions H n'était pas seule en cause puisque le pH critique, du côté acide, était de 5,5 à 5,7 s'il s'agissait de l'acide acétique, et de 4,6 à 5,0 dans le cas de l'acide chlorhydrique. On observait donc une action toxique nette due au radical acétyl.

Enfin, des travaux récents ont montré (ou cru montrer) que la présence de substances diverses : acides aminés, vitamines, hormones, sels minéraux, gaz dissous, etc., pouvait influencer fortement la multiplication microbienne. Malheureusement ces essais ne comportent pas de numérations bactériennes.

Nous rapportons ici, d'après WINSLOW (191), différents temps de génération trouvés dans des milieux naturels.

TEMPS DE GÉNÉRATION TYPES PENDANT LA PHASE LOGARITHMIQUE.

TRAVAUX DE	TYPES D'ORGANISMES	MILIEU	TEMPÉRATURE	TEMPS DE GÉNÉRATION en minutes
CORN (1918).	Bact. du sol	sol labouré	20°	840
JORDAN (1926).	Bact. coli	matière fécale	20°	720
MIQUEL (1894).. . . .	Bact. de l'eau	échantillon en bouteille	20°	196
WHIPPLE (1901).	»	»	24°	115
HARRISSON et VANDERLECK (1909).	Bact. coli	lait	37°	40
BARBER.	Bact. coli	bouillon	37°	17

b) *Influence de la température d'incubation.* — Nous avons déjà vu que MÜLLER (146), au cours de ses premiers essais, avait montré que le temps de génération du bacille typhique augmente de 5 minutes lorsque la température passe de 37 à 40°.

BARBER (10) fit varier les températures d'incubation et constata que le temps de génération du colibacille, pratiquement infini au-dessous de 10°, diminuait rapidement avec l'augmentation de la température, atteignait un minimum vers 37°, conservait sensiblement la même valeur jusqu'à 46°, et augmentait ensuite rapidement pour redevenir infini vers 50°.

JANET E. LANE CLAYPON (41) confirma les résultats de cet auteur. Elle montra qu'entre 20° et 35° l'influence de la température est très régulière, une élévation de 1° produisant toujours la même augmentation de la valeur de croissance, et elle en déduisit que l'action de la température sur la multiplication bactérienne est en accord avec la loi d'ARRHÉNIUS-VAN T'HOFF. Examinant ensuite la durée de la phase logarithmique, LANE CLAYPON constata que cette période était d'autant plus brève, dans le cas du colibacille et du *Bacillus enteritidis*, que la température d'incubation était plus élevée. La multiplication géométrique se prolonge, par exemple, pendant 7 heures et demie à 37°, 8 heures et demie à 30°, 15

heures à 25° et 24 heures à 20°. Des observations analogues furent ensuite faites par Miss H. CHICK (38) et par REED et REYNOLDS (158).

PENFOLD (151) avait montré, d'autre part, que si la croissance à son stade le plus rapide était interrompue par une courte action du froid, il se reproduisait, par rétablissement de la température, une nouvelle croissance sans phase de latence. Si au contraire l'action du froid était plus prolongée, la reprise de la multiplication n'avait lieu qu'après une nouvelle période de latence.

Dans le tableau suivant nous donnons, d'après WINSLOW (191), les temps de génération du colibacille dans différents milieux et à diverses températures.

TEMPS DE GÉNÉRATION DU COLIBACILLE A DIVERSES TEMPÉRATURES
(en minutes).

MILIEU	TRAVAUX DE		
	HARRISSON ET VANDERLECK	BUCHANAN	LANE CLAYPON
	lait	bouillon	bouillon
température			
10°	480	»	»
15°	»	180	»
20°	143	76	78
25°	»	43	52
30°	56	29	»
31°	»	»	32
34°	»	»	28
35°	»	21	»
37°	45	»	»
40°	»	17	»
42°	»	»	19

c) *Influence de l'espèce microbienne.* — Nous venons de voir qu'en étudiant l'influence de la constitution des milieux de culture sur la multiplication bactérienne, HEHEWERTH (98) avait obtenu pour le colibacille et le bacille typhique des temps de génération différents. Dans une autre série d'expériences, cet auteur trouva comme temps de génération minimum 17 minutes pour le colibacille, 20 minutes pour le *Bacillus subtilis*, et 26 minutes pour le bacille typhique.

JANET E. LANE CLAYPON remarqua, elle aussi, que le bacille typhique se multipliait plus lentement que le colibacille.

REED et REYNOLDS (158), en 1916, en cultivant, à 37° dans du lait, un certain nombre de germes constatèrent que la durée de la phase de multiplication géométrique variait de 1 jour pour *Bacterium lactis acidii* et pour *Sarcina lutea*, à 21 jours pour *Micrococcus citricus* et à 42 jours pour *Oidium lactis*.

GRAHAM SMITH (181) pensa avoir trouvé que la vitesse de multiplica-

tion dépendait, dans une certaine mesure, du nombre des repiquages subis par la souche avant l'ensemencement. Une souche, repiquée un certain nombre de fois avant l'ensemencement, donnera une multiplication plus rapide qu'une souche moins souvent renouvelée et permettra également d'obtenir un plus grand nombre de germes. Si ces faits étaient confirmés, on assisterait à une sorte d'entraînement à la multiplication.

d) *Influence de l'âge des microbes au moment de l'ensemencement.* — Il semble que cette influence, si importante quand il s'agit de la phase de latence, n'existe plus maintenant. Nous ne connaissons pas de travaux se rapportant à cette question. Dans tous les cas il semble bien qu'au moment où commence la phase logarithmique, nous n'avons à considérer que des organismes de formation récente, ne pouvant différer les uns des autres que par la durée de cette formation (variation de la phase de latence).

e) *Influence du nombre des microbes ensemencés.* — Il semble que ce facteur, assez bien étudié quand il s'agissait de la phase de latence, a été laissé dans l'ombre lorsqu'on s'est occupé de la phase logarithmique. Tout au plus peut-on signaler un travail de LANE CLAYPON (41), qui a remarqué que cette période était d'autant plus courte que les ensemencements étaient plus abondants.

On voit donc que la phase logarithmique a été moins bien étudiée que la phase de latence. Seuls des auteurs, tels que COHEN et CLARK (42), ont montré toute son importance. En 1919, P. F. CLARK et W. H. RUEHL (40), pour expliquer son existence, supposèrent que les substances toxiques, qui à de fortes concentrations arrêtent la division cellulaire et provoquent la destruction des organismes, peuvent au contraire, lorsqu'elles sont suffisamment diluées, favoriser la multiplication bactérienne. Ils s'appuyaient pour cela sur les travaux de JENNINGS, qui avait montré que la fertilisation chez les infusoires est due à une excitation (stimulus) se rapprochant beaucoup d'une lésion des organismes, et sur les travaux de LOEB qui, avec d'autres auteurs, avait indiqué que l'on pouvait stimuler la division cellulaire (grenouille parthénogénétique) par attaque mécanique des œufs.

La durée de la phase de multiplication logarithmique dépend du freinage qu'exerce sur la multiplication la poussée même des microbes. Les hypothèses, que nous examinerons plus loin, et qui ont été émises pour expliquer le ralentissement de la multiplication microbienne, peuvent donc s'appliquer également à la durée de la phase logarithmique. Rappelons également que des formules mathématiques, se rapportant à cette période, ont été proposées par différents auteurs comme PENFOLD et LEDINGHAM (120), et SLATOR (178).

C. — Phase de multiplication ralentie.

Cette phase a été mise en évidence par J. E. LANE CLAYPON (41), MISS H. CHICK (38), ALAN M. CHESNEY (37) et GRAHAM SMITH (181). Elle

est en général assez longue et sa durée varie de 12 à 24 heures. C'est la phase banale, dans laquelle on se place presque toujours inconsciemment, quand on examine une cultureensemencée 24 heures auparavant. Pendant cette période les facteurs d'inhibition entrent en jeu et la multiplication se ralentit peu à peu. Les bactéries augmentent de nombre mais de plus en plus lentement, les temps de génération croissent continuellement et tendent vers l'infini.

Quoi qu'il en soit la phase de multiplication ralentie a été très peu étudiée. Il semble pourtant qu'elle ne le cède en rien, comme intérêt, aux deux premières périodes. Il paraît en effet, à priori, fort intéressant de suivre, en regard du ralentissement de la poussée microbienne, la formation de produits nuisibles provenant du métabolisme bactérien, comme par exemple la production d'acide dans la fermentation lactique.

Nous connaissons bien peu de travaux ayant trait à cette période et nous pouvons tout au plus signaler les observations de GRAHAM SMITH. Comme celles-ci se rapportent également à la grandeur du chiffre maximum atteint par les microbes, nous les examinerons plus loin et nous étudierons, en même temps, les différentes hypothèses qui ont été émises pour expliquer l'apparition, la longueur et le rythme de la phase de multiplication ralentie.

Certains auteurs, comme SLATOR (178), ont voulu traduire par des équations la courbe de multiplication ralentie. Il semble cependant fort difficile de pouvoir donner, pour une période aussi variable, des formules générales.

D. — Phase de maximum stationnaire.

La durée de cette période n'est en général que de quelques heures. Cependant, dans différents cas, JANET E. LANE CLAYTON (41) a trouvé qu'elle pouvait se prolonger de 2 à 4 jours selon la température. Pendant cette phase le nombre des bactéries se maintient sensiblement constant. Ce chiffre maximum permet de se rendre compte de la valeur nutritive d'un milieu et de la vitalité d'une souche microbienne. Malgré cela les expériences précises se rapportant à cette question sont assez peu nombreuses et nous ne trouvons guère que les travaux de GOTSCHLICH et WEIGANG (86), en 1895, et ceux de GRAHAM SMITH (181) en 1920.

GOTSCHLICH et WEIGANG, en étudiant le développement du vibron cholérique sur bouillon gélosé, constatèrent que le maximum obtenu était assez indépendant du nombre des microbesensemencés, mais qu'il variait avec la souche utilisée et avec la température d'incubation. C'est ainsi que, tandis que pour une température de 37° le maximum est atteint vers la 20^e heure, pour une température de 22° ce maximum n'a lieu que le 2^e jour mais il est alors beaucoup plus élevé.

Pour GRAHAM SMITH le chiffre maximum dépend, avant tout, de la quantité de matières nutritives contenues dans le milieu de culture et de la

température d'incubation. Quand on ensemence avec un petit nombre de staphylocoques dorés des milieux de culture renfermant uniquement de l'extrait de viande, sans addition de sel ou de peptone, on constate que le maximum obtenu est plus élevé dans les tubes les plus riches et qu'il y est atteint plus lentement. Si, après avoir atteint la période de destruction des bactéries, on ajoute une petite quantité d'extrait de viande en solution concentrée (proportion insuffisante pour produire une dilution appréciable), la multiplication bactérienne repart et elle est sensiblement proportionnelle à la quantité de matières nutritives ajoutées. Il est même possible de maintenir, pendant une longue période, une concentration définie de staphylocoques en procédant à des additions, faibles mais régulières, d'extrait de viande. Il semble que l'accumulation des déchets microbiens puisse graduellement empêcher la croissance, mais ce dernier point n'est pas absolument évident.

Si on dilue modérément la culture avec de l'eau distillée, on observe que la multiplication a lieu comme d'habitude mais que le nombre d'organismes dans chaque unité standard est inversement proportionnel à la dilution.

Pour SMITH, la chute des nombres qui suit l'accroissement initial n'est donc pas due à l'accumulation de substances toxiques, mais semble causée surtout par la disparition des substances nutritives.

D'après cet auteur, la température d'incubation a une grande influence sur l'évolution de la multiplication bactérienne. Ainsi à 37° la multiplication est très rapide et le maximum est obtenu le 2^e ou le 3^e jour ; à 27° le maximum est atteint vers le 5^e ou le 6^e jour mais il est beaucoup plus grand que le précédent ; à 17° la croissance, d'abord très lente, devient ensuite plus rapide et le maximum, supérieur aux deux premiers, a lieu le 8^e jour ; enfin, à 8° il se produit parfois une très légère multiplication pendant la première journée mais le nombre des microbes diminue ensuite lentement pendant 60 jours. Pour des températures inférieures le nombre des bactéries décroît rapidement et on assiste à la mort des cultures (en 19 jours à — 1° et en 9 jours à — 10°).

Enfin GRAHAM SMITH montra que tandis que des ensemencements différents mais faibles fournissent, après 24 heures de culture, des résultats très voisins, des ensemencements très dissemblables peuvent conduire à des courbes de croissance un peu différentes. Un faible ensemencement donne, après une multiplication rapide, un nombre maximum de germes ne dépassant guère 1 milliard par centimètre cube. Si on ensemence au contraire un nombre de germes atteignant ce chiffre la division cellulaire est beaucoup plus lente.

E. — Phase de destruction des bactéries.

Après avoir passé par un maximum le nombre des bactéries décroît, d'abord doucement, puis rapidement, et enfin un peu plus lentement.

Pour GOTSCHLICH et WEIGANG (86) la diminution du nombre des microbes « vivants » est de plus en plus lente au fur et à mesure du vieillissement. Elle peut s'exprimer par une courbe qui tourne sa convexité vers les abscisses d'abord rapidement, puis de plus en plus lentement, pour terminer presque en asymptote.

GRAHAM SMITH, dans les essais dont nous avons parlé tout à l'heure, trouve qu'après le maximum le nombre des organismes « vivants » décroît d'abord rapidement, puis plus lentement, jusqu'à ce qu'il atteigne un niveau assez bas, qui reste à peu près constant pendant une longue période ou tombe fort lentement. Durant cette dernière phase on observe de faibles oscillations du nombre.

Pour BUCHANAN (30) la phase de destruction rapide serait aussi géométrique, c'est-à-dire que la courbe des logarithmes des nombres en fonction des temps serait représentée par une droite qui (à l'inverse de ce qui se passe pour la deuxième phase) serait de pente négative.

Cette phase de destruction microbienne a été encore moins étudiée que les précédentes. On pourrait sans doute y rencontrer des analogies avec ce qu'on observe lorsqu'on examine l'action des antiseptiques.

GOTSCHLICH et WEIGANG (86), dans leurs expériences faites avec le vibron cholérique, montrèrent que les organismes d'une culture maintenue à 37° se détruisent rapidement. Dans une masse microbienne, qui à la 20^e heure contenait sensiblement 1 milliard de microbes capables de se reproduire sur gélatine, il ne reste plus, après deux jours, que 10 pour 100 des individus vivants. Après trois jours cette proportion n'est plus que de 1 pour 100. Si au contraire on conserve à basse température une culture âgée de 20 heures et développée à 37°, on observe que la diminution du nombre des microbes capables de se reproduire sur gélatine est beaucoup plus lente. Après 9 jours il subsiste encore 10 pour 100 des individus « vivants ».

F. — Hypothèses émises par différents auteurs pour expliquer le ralentissement puis l'arrêt de la multiplication microbienne.

Les différentes causes qui produisent le ralentissement, puis l'arrêt, de la multiplication microbienne sont encore mal déterminées, et les hypothèses qui ont été émises pour expliquer ce phénomène peuvent être divisées en deux groupes, qui s'opposent d'ailleurs l'un à l'autre. L'arrêt de la multiplication bactérienne peut être attribué soit à l'épuisement du milieu, épuisement portant sur les différents éléments nutritifs ou seulement sur quelques composés spéciaux ; soit à l'accumulation de substances résultant du développement microbien. Ces substances sont produites par le métabolisme même (accumulation d'acides, de bases, de produits résiduels toxiques), ou sont sécrétées par les bactéries (sortes de toxines).

Le premier ENKMAN (60), en 1904, envisagea ces deux hypothèses et essaya de les vérifier. Dans un premier stade, il montra qu'il suffisait de

chauffer un milieu ayant déjà servi à la culture d'une bactérie pour le rendre de nouveau favorable à la poussée de cette même bactérie. Il remarqua en même temps, sans sembler y attacher grande importance, qu'un milieu épuisé par le développement d'un microbe permettait cependant la multiplication d'une espèce bactérienne différente. Pour cela EIJKMAN ensemença une souche A de colibacille sur plusieurs tubes contenant un milieu nutritif à la gélatine. Au bout de 2 jours de culture, il liquéfia ces tubes à 37° et, après solidification, il les réensemença avec trois souches A, B et C de colibacille. Dans ces conditions la souche A ne pouvait pas se développer, tandis que les souches B et C se multipliaient faiblement. L'auteur recommença cette expérience après avoir porté tous les tubes dans l'eau bouillante et il constata que, cette fois, les trois souches se reproduisaient normalement. Cet essai était encore insuffisant pour permettre de faire un choix entre les deux hypothèses précédentes. La cuisson pouvait fort bien détruire les substances inhibitrices mais elle pouvait aussi, par destruction des corps bactériens, remettre en liberté les matières nutritives nécessaires.

Dans une deuxième série d'expériences, l'auteur montra qu'il suffisait de filtrer sur bougie la coli-gélatine fondue (gélatine ayant servi à la culture du colibacille), pour la rendre apte à une nouvelle culture.

Il semblait donc que l'on pouvait éliminer l'hypothèse de l'épuisement du milieu, et attribuer l'arrêt de la multiplication bactérienne à la présence de « substances empêchantes » détruites par la chaleur et non filtrables. Il est à remarquer que MIQUEL (144) avait déjà signalé qu'une eau, épuisée par une première culture, perdait sa « toxicité » pour les bactéries lorsqu'on la portait à l'ébullition. D'autres auteurs, tels que FRANKLAND (67) avaient également observé des faits semblables.

Après avoir constaté que ces « substances empêchantes » étaient détruites par la chaleur exactement dans les mêmes conditions que les bactéries, EIJKMAN en vint à supposer que l'arrêt de la poussée microbienne pouvait être également provoqué par la présence même des bacilles vivants. Il abandonna bientôt cette hypothèse pour en revenir à la précédente, et il montra que ces « substances empêchantes » étaient également diffusibles. Pour cela une plaque de gélatine stérile fut largement ensemencée avec du colibacille. Une portion fut laissée à découvert et on recouvrit le reste, partie avec de la coli-gélatine, et partie avec de la gélatine stérile. Dans ces conditions l'auteur constata que la culture se développait sur toute la surface de l'ensemencement sauf dans la région recouverte par la coli-gélatine. Si on enlevait alors celle-ci on observait que, même après un nouvel ensemencement, il ne se produisait pas de croissance visible. Dans une seconde expérience, EIJKMAN trempa une feuille de papier dans la gélose fondue et obtint ainsi, sur les 2 faces de la feuille, une couche de milieu nutritif épaisse de 1 millimètre environ. Un côté fut alors ensemencé superficiellement avec du colibacille. Trois jours plus tard on retourna la feuille et on ensemença l'autre côté avec la même souche de colibacille. Il

ne se produisit aucun développement. La feuille fut alors chauffée pendant 30 minutes à 65° et réensemencée. Dans ces conditions on observa une multiplication bactérienne.

Les expériences de EIJKMAN montrent donc que l'arrêt de la croissance microbienne est dû à la production de *substances empêchantes, diffusibles, thermolabiles et non filtrables*. Enfin nous ajouterons que cet auteur étudia l'action inhibitrice exercée par une espèce bactérienne sur une autre espèce, et qu'il fut sans doute le premier à concevoir, pour différencier et isoler les organismes, la préparation de milieux cultivés et ainsi rendus inaptes à la poussée des microbes responsables de ces premières cultures.

En 1906, OTTO RAHN (157) en étudiant le développement du *Bacillus fluorescens liquefaciens* en bouillon peptoné salé, observa qu'une nouvelle croissance énergique pouvait avoir lieu dans de vieilles cultures en bouillon, filtrées sur argile ou traitées par la chaleur. Il en conclut donc, à son tour, que les produits nuisibles à la multiplication bactérienne étaient non filtrables et thermolabiles. D'après l'auteur ces produits sont sécrétés par les microbes et n'appartiennent pas au groupe des substances produites par le métabolisme microbien. OTTO RAHN constata que ces produits sont détruits par la lumière diffuse et par un chauffage de 2 minutes à l'ébullition, mais qu'ils résistent à un chauffage de 48 heures à 40 ou 45°.

En 1916, ALAN M. CHESNEY (37) remarqua que les substances responsables de l'arrêt de la multiplication microbienne pouvaient devenir moins actives par vieillissement de la culture. Le liquide obtenu en filtrant au bout de 24 heures une culture de pneumocoques s'oppose à un nouveau développement de ce microbe. Au contraire le filtrat d'une culture âgée de 4 jours permet de nouvelles poussées pneumococciques.

Tous ces travaux semblent bien montrer que l'arrêt de la multiplication bactérienne n'est pas produit par l'épuisement du milieu, mais qu'il résulte de l'accumulation de substances inhibitrices sécrétées par les microbes eux-mêmes.

La question des milieux devenus impropres au développement d'une bactérie déterminée à la suite d'une première culture de ce même micro-organisme (milieux dits « vaccinés »), a donné lieu à de nombreux travaux de MARMORECK, BESREDKA, BERDNIKOW, etc. BESREDKA (17-20) et ses élèves ont montré que, suivant les espèces microbiennes, cette « immunité » du milieu « vacciné » peut manquer dans le premier filtrat d'une culture parvenue au terme de son développement, mais qu'elle existe dans les filtrats provenant d'une seconde ou d'une troisième culture obtenues par réensemencements des filtrats successifs. BESREDKA attribue l'action inhibitrice des milieux épuisés par une ou plusieurs cultures successives à la présence d'une substance thermostable, atoxique et spécifique, se détachant facilement du corps du microbe et à laquelle il a donné le nom d'« anti-virus ». Cette substance possède des propriétés vaccinales qui, en particulier, ont conduit l'auteur à la préparation d'un pansement antistaphylococcique ou antistreptococcique et à l'obtention d'un vaccin anticholérique.

Pour d'autres auteurs, au contraire, l'arrêt de la multiplication microbienne est produit par l'épuisement du milieu.

En 1911, MAC KENDRICK et PAÏ (111), dans leur étude du développement du colibacille, en bouillon ordinaire, écrivent que les organismes se multiplient dans une culture par simple conversion de l'aliment disponible en d'autres organismes, et que le degré de multiplication est proportionnel à la concentration de la substance nutritive.

En 1920, GRAHAM SMITH (181), dans le travail que nous avons analysé à propos de la phase de maximum stationnaire, soutint la même théorie. Il observa pourtant qu'il y avait une sorte de spécificité dans la destruction des matières nutritives. C'est ainsi que si dans des cultures complètement développées de staphylocoque jaune, de bacille pyocyanique ou de colibacille on réensemence le germe initial, il ne se produit qu'une multiplication faible ou nulle. Si, au contraire, ce nouvel ensemencement est fait avec une espèce différente, on observe une poussée assez nette. L'auteur remarqua également que si des cultures sont stérilisées par ébullition, la souche originelle elle-même pourra s'y multiplier après un nouvel ensemencement. La chaleur semble donc libérer quelque substance utile à la croissance des microorganismes.

En 1924, J. EFFRONT (59), constatant qu'on ne peut pas expliquer l'arrêt d'une fermentation par l'épuisement du milieu ou par l'accumulation de produits formés au cours de la division cellulaire, l'attribue à une modification dans la répartition des différents éléments nutritifs. D'après cet auteur, les substances nutritives d'un bouillon de culture s'y trouvent en proportions bien déterminées caractéristiques du milieu utilisé. Au cours de la fermentation les changements produits dans la composition du liquide nutritif se traduisent par des variations dans les rapports qui règlent l'équilibre des différentes substances. Ces variations seraient suffisantes pour expliquer les différentes phases de la fermentation. Malheureusement EFFRONT n'a effectué ses expériences qu'avec des moisissures ou des levures sans s'occuper des bactéries.

En résumé, et si nous laissons de côté l'hypothèse suggérée par PENFOLD (151) pour expliquer en même temps la phase de latence (théorie de la synthèse par échelons des corps protoplasmiques), le ralentissement puis l'arrêt de la multiplication microbienne peuvent être dus :

1° à l'épuisement progressif puis total des éléments nutritifs simples : carbone, azote, phosphore, etc ;

2° à l'épuisement de composés moins connus : acides aminés particuliers, vitamines spéciales de croissance, etc. ;

3° à la production, du fait même du métabolisme microbien, de substances de déchets nuisibles : acides (acétique, lactique, etc.), ammoniaque, etc. ;

4° à la sécrétion par les bactéries de substances analogues à des toxines, qui viendraient « vacciner » le milieu contre ces mêmes microbes.

Quoi qu'il en soit cette question s'avère dès le début d'une grande complexité et il est probable, qu'à l'inverse de la question de latence, elle

ne pourra pas recevoir une réponse simple, valable pour tous les milieux, vraie pour tous les microbes. Il est tout à fait vraisemblable que des phénomènes d'arrêt analogues à ceux qui se produisent dans la fermentation du lait, et qui sont dus presque indiscutablement à l'acidité engendrée par les microbes, ne se retrouvent plus avec la même netteté dans les bouillons de culture ordinaires ensemencés avec d'autres microbes.

Bien plus, pour une même bactérie, l'arrêt de la multiplication ne se produit pas de la même façon dans les différents milieux. Les travaux de COHEN et CLARK (42) nous avaient déjà montré que la durée du temps de génération était influencée, non seulement par la concentration en ions H, mais encore par la nature de l'acide ayant servi à la neutralisation du milieu. Dans d'autres expériences, en ensemencant du colibacille dans un milieu peptoné, phosphaté et glucosé, ces auteurs montrèrent que la multiplication des cellules s'arrêtait au voisinage de pH 5,5 à 5,7, tandis que la fermentation se poursuivait jusqu'à un pH égal à 4,6 ou 5,0. On assistait donc à la dissociation de ces deux phénomènes. En outre en cultivant ce même bacille dans un bouillon peptoné sans sucre, COHEN et CLARK observèrent que la multiplication cessait bien plus vite et avec une concentration en cellules 20 fois plus petite que dans le cas précédent. Le pH était cependant resté favorable pendant toute la durée de l'expérience.

COMPARAISON, AU COURS DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE, DU NOMBRE DES MICROBES « VISIBLES » AU NOMBRE DES MICROBES « VIVANTS »

Très peu d'auteurs comparèrent ces deux catégories de bactéries.

En 1901, HEHEWERTH (98) employa concurremment la méthode de KLEIN pour la numération directe de la totalité des germes, et celle de NEISSER pour la numération des microbes capables de se reproduire sur plaques de gélose. Il étudia ainsi la multiplication du vibron cholérique, du colibacille et du bacille typhique sur gélose et en bouillon et il obtint les résultats suivants :

Dans une culture sur gélose inclinée, largement ensemencée et mise à l'étuve à 37°, on constate, en comparant à des heures diverses le nombre total des bactéries au nombre des microbes vivants, que le premier chiffre est toujours plus grand que le second, même pour une culture âgée seulement de 5 heures et demie. Au fur et à mesure du vieillissement cette différence s'accroît et devient bientôt considérable. En effet le nombre total des bactéries ne cesse d'augmenter, après avoir toutefois présenté un arrêt entre la 10^e et la 25^e heure, tandis que le nombre des bactéries vivantes, après avoir passé par un maximum entre la 10^e et la 25^e heure, décroît continuellement.

En bouillon les résultats obtenus sont semblables. L'auteur admet pourtant qu'il existe peu de différence, pendant les premières heures de la culture, entre le nombre des microbes « visibles » et le nombre des

microbes « vivants ». En outre ceux-ci paraissent diminuer moins rapidement en bouillon que sur gélose.

Enfin HEHEWERTH mit en évidence le temps de latence dans les premières heures de la culture mais il lui fallut, pour cela, utiliser des ensemencements très faibles et par conséquent employer, uniquement, la méthode des plaques de NEISSER.

Des recherches analogues furent entreprises par WILSON (190) en 1922. L'auteur constata également qu'en général le nombre des microbes « viables » n'atteint pas celui des microbes « visibles ». A la fin de la période logarithmique le rapport de ces deux nombres est égal, en moyenne, à 65/100. Il remarqua cependant que dans certains cas, vers le milieu ou la fin de la période logarithmique, ces deux nombres peuvent être identiques, mais il fut incapable d'expliquer cette anomalie. De l'ensemble de ses résultats, WILSON pensa pouvoir déduire que la formule proposée par BÜCHNER pour calculer le nombre de bipartitions survenant dans un temps donné était inexacte. Cette formule suppose que le nombre des germes double après chaque génération. Pour WILSON il n'en est pas ainsi ; puisque le nombre des microbes visibles est plus grand que celui des microbes vivants, ceci prouve que seule, une certaine proportion des germes formés, est capable de se reproduire. Si par exemple 80 pour 100 seulement des bactéries sont viables, la formule primitive de BÜCHNER $x = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$ devient $x = \frac{\log b - \log a}{\log 1,6}$. Par suite les temps de génération calculés par les différents auteurs sont tous trop faibles.

Les conclusions de WILSON sont assez discutables et il est, en particulier, assez dangereux d'admettre que seuls sont capables de se multiplier dans leur milieu originel liquide les microbes, qui, transplantés sur un milieu solide, donnent des colonies visibles.

Nous voyons donc que très peu d'auteurs ont songé à comparer systématiquement les résultats donnés par ces deux méthodes de numération. Il n'existe aucun travail de ce genre se rapportant à la phase de latence puisque HEHEWERTH, pour cette période de la multiplication microbienne, n'a pas pu utiliser la méthode de numération de KLEIN. Il est regrettable que, dans des recherches aussi délicates, les différents auteurs n'aient pas pensé à utiliser deux techniques différentes qui auraient pu, soit se confirmer mutuellement, soit, en donnant des résultats discordants, attirer leur attention vers des phénomènes ignorés.

REMARQUES RELATIVES AUX TRAVAUX PRÉCÉDEMMENT EXPOSÉS. BUTS QUE NOUS NOUS SOMMES PROPOSÉS

Nous avons vu, en parcourant les différents travaux des auteurs précédents, que le mécanisme de la multiplication microbienne est encore loin d'être complètement éclairci. Par exemple, nous ne connaissons pas exac-

tement l'influence exercée par le nombre des germes ensemencés sur l'importance de la phase de latence, et nous ne savons pas, en général, pour quelles raisons la multiplication bactérienne se ralentit et finit par s'arrêter.

En outre, comme nous l'avons déjà dit, presque tous les essais se rapportant à la multiplication microbienne ont été effectués en procédant uniquement à la numération des germes capables de se reproduire sur un nouveau milieu solide. En utilisant cette méthode, les différents auteurs pensaient obtenir le nombre des microbes « viables » existant dans le milieu de culture liquide dans lequel ils suivaient la multiplication. Nous avons déjà vu qu'en généralisant ainsi on risquait peut-être de commettre une erreur et qu'il aurait été préférable de remplacer le terme de « microbes viables » ou « microbes vivants » par celui de « microbes viables après transplantation sur gélose ou sur gélatine ».

En 1927, J. RÉGNIER et S. LAMBIN (160), avant d'entreprendre l'étude des antiseptiques en tenant compte à la fois du nombre des microbes ensemencés et du nombre des germes résistants à l'action de ces agents, avaient suivi la multiplication bactérienne en procédant à des numérations microscopiques comparatives de tous les germes visibles. En suivant de cette façon la poussée du bacille pyocyanique dans un bouillon de culture, ils observèrent que la phase de latence n'existait pas, que la phase logarithmique très brève était assez peu nette et que, si l'on s'en tenait aux chiffres moyens trouvés, la phase de multiplication ralentie paraissait se produire aussitôt après l'ensemencement. J. RÉGNIER et S. LAMBIN pensèrent que ces résultats, très différents de ceux des autres auteurs, pouvaient être dus à des ensemencements très abondants. En effet, tandis que les travaux étrangers étaient effectués à partir d'ensemencements très faibles et très inférieurs à ceux qu'on utilise journellement dans la pratique bactériologique, RÉGNIER et LAMBIN ensemençaient 10 millions de germes par centimètre cube.

De nouvelles recherches furent ensuite entreprises, dans le laboratoire de M. le P^r RADAIS, pour chercher à expliquer cette contradiction.

J. RÉGNIER et M^{me} A. KAPLAN, en procédant concurremment à la numération microscopique de tous les germes visibles et à la numération de tous les germes capables de se multiplier sur gélose solidifiée, étudièrent l'influence de la grandeur de l'ensemencement sur le développement du bacille pyocyanique en bouillon à l'extrait de viande LIEBIG.

De notre côté, nous avons suivi la multiplication de ce même bacille pyocyanique dans différents milieux de culture.

Dans la première partie de notre travail, partie uniquement bactériologique, nous avons étudié, à l'aide des deux méthodes de numération également utilisées par les auteurs précédents, l'influence de la composition du milieu de culture sur la multiplication microbienne. Cette influence peut se traduire par une croissance plus rapide ou par la production d'un plus grand nombre de germes. La méthode employée nous renseignera donc sur la valeur des milieux utilisés et nous permettra de voir

quel est le milieu le plus favorable à la culture du bacille pyocyanique.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons voulu voir si les différences observées dans les multiplications ainsi étudiées, différences portant particulièrement sur le chiffre maximum des germes formés, pouvaient s'expliquer par des variations dans la composition des milieux utilisés. Il était, en effet, intéressant de savoir s'il y avait un véritable avantage à préparer des milieux très riches en matières nutritives. Nous avons cherché à nous rendre compte également si, au moment où le nombre des germes « vivants » passe par un maximum avant de décroître, l'analyse chimique montrait une modification nette dans la constitution du milieu en expérience, modification qui pourrait expliquer l'arrêt de la multiplication microbienne. Nous avons comparé pour cela la composition initiale de nos milieux de culture à la composition de ces mêmes milieux ensemencés et filtrés sur bougie après un séjour de 48 heures à l'étuve à 37°.

Dans ce premier travail, en plus de certaines déterminations physiques relatives au pH, à la tension superficielle, et au pouvoir rotatoire, nous n'avons étudié que le carbone, l'azote, le phosphore, le soufre et le chlore. Ces éléments sont les plus connus et tiennent indiscutablement la plus grande place dans le métabolisme microbien. Plus tard nous reprendrons ces essais en dosant, avant et après la poussée microbienne, les éléments minéraux dont la présence est indispensable à la constitution de la bactérie. Enfin élargissant notre sujet, nous rechercherons si l'addition de substances diverses (sucres, phosphates, etc...) à des milieux relativement simples (eau peptonée par exemple) augmente la valeur nutritive de ceux-ci.

Cette méthode est probablement moins précise que celle qui consiste, à la manière de RAULIN, à introduire par quantités connues, dans des milieux absolument synthétiques, les substances les plus diverses, substances banales et substances rares. Elle est sans doute moins exacte, au pur point de vue analytique, que celle qui consisterait à rechercher et à doser si possible tous les éléments d'une masse microbienne isolée. Elle présente par contre l'avantage de nous faire assister à la vie même des cellules bactériennes, elle peut nous donner des chiffres valables pour l'étude des grands phénomènes de la nutrition microbienne et elle doit nous renseigner sur l'importance de la teneur des milieux en tel ou tel élément. Elle pourra par conséquent contribuer à apporter un peu de lumière sur les phénomènes si complexes de la vie des microbes. Enfin cette méthode va nous renseigner directement sur la valeur pratique des milieux que nous utilisons journellement. Certains de ceux-ci sont fort simples, et en quelque sorte déjà synthétiques (eau peptonée par exemple), d'autres ne sont obtenus qu'après une préparation assez compliquée (bouillon ordinaire, bouillon panse-foie). Il n'est pas indifférent de connaître si les éléments principaux de ces milieux s'y rencontrent à des concentrations semblables ou différentes, et si la valeur nutritive de ces liquides est en rapport avec les difficultés de leur préparation.

CHAPITRE III

ÉTUDE NUMÉRIQUE DE LA MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE LIQUIDES, ORDINAIRES OU SYNTHÉTIQUES

Comme nous l'avons déjà indiqué, nous avons voulu rechercher si la composition des milieux exerce une influence sur la multiplication des bactéries dans une culture, si, suivant la nature et la quantité des aliments offerts au bacille, on observe des modifications dans le nombre des germes produits, la vitesse et le rythme de leur multiplication, ou la durée de leur survie.

A cet effet nous avons utilisé un certain nombre de milieux liquides, d'une préparation simple et en général d'un usage courant dans les laboratoires, et deux milieux chimiquement définis.

Les liquides employés ont été les suivants :

- 1° Eau peptonée simple ;
- 2° Eau peptonée salée ;
- 3° Macération de viande riche en matières nutritives ou première macération de viande ;
- 4° Macération de viande pauvre en matières nutritives ou seconde macération de viande ;
- 5° Bouillon peptoné salé ;
- 6° Bouillon à l'extrait de viande LIEBIG ;
- 7° Bouillon MARTIN ;
- 8° Milieu synthétique de LIOT ajusté à pH 7,0 ;
- 9° Milieu synthétique d'AUBEL ajusté à pH 7,0 par addition de solution normale de soude.

Nous avons ainsi réalisé une échelle de milieux nutritifs dont la teneur en azote varie de 0^{gr},50 par litre pour la deuxième macération de viande à 4 grammes par litre pour le bouillon à l'extrait de viande LIEBIG et, dont la teneur en carbone passe de 1 gramme par litre pour le premier de ces liquides à 12^{gr},50 par litre pour le second. Ces milieux sont donc suffisamment différents les uns des autres, et nous pouvons espérer trouver

des différences sensibles en comparant l'évolution de la multiplication microbienne dans ces différents liquides. Nous allons exposer successivement la préparation de ces milieux, les caractéristiques de la souche microbienne utilisée, et les résultats que nous avons obtenus.

PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

La préparation des milieux de culture, souvent faite avec une certaine approximation, nécessite au contraire de grandes précautions lorsqu'on veut obtenir des produits possédant des caractères sensiblement constants.

Dans un travail considérable, se rapportant à l'élaboration de la toxine tétanique, A. BERTHELOT, G. RAMON et M^{lle} AMOUREUX (14) ont mis en évidence les principaux facteurs qui influent sur la composition et les propriétés des milieux de culture. Parmi ceux-ci les plus importants, au point de vue qui nous occupe, ont trait à la nature de l'eau, de la viande et de la peptone entrant dans la préparation des milieux, au mode opératoire suivi, à la température de stérilisation et à la nature des récipients utilisés au cours des différentes opérations. Nous allons passer en revue ces différents facteurs et nous indiquerons, en même temps, comment nous en avons tenu compte.

a) *Influence de la nature de l'eau utilisée.* — A. BERTHELOT et ses collaborateurs ont obtenu des résultats irréguliers en utilisant, pour leurs essais, une eau distillée, préparée dans de mauvaises conditions, ou une eau potable délivrée par le service des eaux de la ville de Paris. Dans ce dernier cas, ils attribuent leurs insuccès à la présence possible de traces du chlore ajouté pour la stérilisation. Dans nos essais nous avons toujours employé l'eau distillée préparée à la Faculté de Pharmacie, cette eau nous a toujours donné de bons résultats.

b) *Influence de la nature de la viande employée.* — Les auteurs précédents ont également montré que, pour obtenir des macérations de composition à peu près constante, il était nécessaire d'utiliser de la viande très fraîche et de ne la faire hacher qu'à son arrivée au laboratoire. Nous n'avons pas pu pousser aussi loin nos recherches, et nous nous sommes contentés de hacher au laboratoire de la tranche de bœuf maigre, achetée le matin même, et de peser exactement la viande ainsi divisée.

c) *Influence de la nature de la peptone ajoutée à la macération de viande.* — Les diverses peptones diffèrent les unes des autres non seulement par leur mode de préparation, digestion pepsique ou digestion pancréatique, mais encore par la constitution des matières premières employées pour les préparer : viande, poisson, fibrine, sang, caséine, gélatine, etc... Il est donc normal que la biologie des bactéries soit modifiée par la nature des peptones mises à leur disposition. Ce fait, déjà signalé par L. GRIMBERT (89), a été particulièrement étudié par L. BOEZ (23) et par A. BERTHELOT, G. RAMON et M^{lle} AMOUREUX (14). Ces derniers auteurs ont montré, par exemple, que pour obtenir une toxine tétanique très

active il était nécessaire d'utiliser une peptone pepsique de viande de bœuf. En employant au contraire une peptone pancréatique de sang total, on observait bien un développement microbien très abondant, mais les cultures filtrées se montraient presque dépourvues de toxicité. La richesse d'une culture en toxine n'est donc pas toujours en rapport avec le nombre des germes qu'elle renferme.

Nous avons utilisé dans tous nos essais de la peptone bactériologique BYLA en ayant soin de réserver le même flacon pour chaque série d'expériences comparables. A. BERTHELOT et M^{lle} M. CHADUC (15) ont résumé les différents caractères qui peuvent servir à l'identification d'une peptone. Nous avons essayé d'obtenir des données plus précises de la maison BYLA au sujet de la composition ou du mode de préparation de son produit. Le seul renseignement qui nous a été fourni est relatif au mode de préparation. Nous avons eu entre les mains une peptone pancréatique de viande de bœuf. Les caractères pouvant servir à son identification seront donc donnés au moment de nos essais personnels relatifs à l'eau peptonée.

d) *Influence de la réaction du milieu.* — Tous nos milieux ont été ajustés à pH 7,0 au moyen de la méthode colorimétrique. Nous avons utilisé comme indicateur le bleu de bromothymol et comme gamme-étalon l'échelle de CLARK et LUBS. L'alcalinisation a toujours été faite au moyen de lessive de soude diluée. La réaction ainsi obtenue était favorable à la multiplication du bacille pyocyanique puisque, d'après DERNBY (52), cette bactérie se développe entre pH 5,6 et pH 8,0 et présente un optimum de poussée pour un pH compris entre 6,6 et 7,0. Quand la préparation de nos milieux nécessitait 2 stérilisations successives, nous avons vérifié que la réaction n'avait pas changé sensiblement après le premier chauffage.

e) *Influence de la température de stérilisation.* — Différents auteurs, parmi lesquels A. BERTHELOT (14) et L. BOEZ (23), ont obtenu de meilleurs résultats avec des milieux stérilisés à 100° ou 105° qu'avec les mêmes liquides portés à une température supérieure. Comme nous avions pour but d'étudier la multiplication du bacille pyocyanique dans les milieux couramment employés, nous avons stérilisé ceux-ci à des températures usuelles c'est-à-dire à 115 et 120°. Seuls les milieux synthétiques ont été stérilisés par trois chauffages de 1 heure à 100°, exécutés à 24 heures d'intervalle.

f) *Influence de la nature des récipients utilisés pour la préparation et la stérilisation des milieux de culture.* — Un milieu de culture ne doit pas être préparé dans un récipient susceptible de céder à ce liquide des principes divers. S. SCHMIDT (169) avait remarqué que lorsqu'on préparait, en vue de la production de toxine diphtérique, du bouillon MARTIN dans des vases en métal émaillé, on obtenait des résultats tout à fait défavorables. Il attribuait ce phénomène à la présence de traces de métal, dissoutes par le liquide très acide qui pouvait pénétrer à travers les fêlures de l'émail des récipients. Des observations analogues furent faites par A. BERTHELOT, G. RAMON et M^{lle} AMOUREUX (14). En utilisant, pour

la préparation de leur bouillon, des récipients à bon marché recouverts d'un émail très tendre, ces auteurs obtinrent un milieu qui, tout en permettant un développement microbien normal, ne donnait qu'une toxine très atténuée. Dans ce cas encore, sous l'influence de l'ébullition, l'émail avait cédé des éléments minéraux au liquide mis en œuvre.

La stérilisation nécessite également l'emploi de récipients pratiquement inattaquables. En étudiant l'influence de la tyrosine sur le développement du bacille pyocyanique, A. BERTHELOT (16) a montré que des verres alcalins, au cours de la stérilisation, réagissaient sur ce corps pour donner des traces de produits ammoniacaux. Ceux-ci favorisaient alors très fortement la multiplication du bacille pyocyanique. De même un bouillon ajusté à pH 7,3 voit celui-ci passer à 8,3 ou 8,5, lorsqu'on le stérilise, pendant 20 minutes à 115°, dans du verre blanc tendre et neuf. Quand, au contraire, la même opération est faite dans du pyrex le pH s'abaisse de 7,3 à 7,0.

Dans tous nos essais les macérations de viande ont été faites dans de grandes capsules de porcelaine. La coagulation des albumines a été réalisée dans un récipient en émail, récipient dit « pot-au-feu », de bonne qualité, en bon état, et utilisé depuis assez longtemps dans ce but. Tous les chauffages à l'autoclave et la répartition finale ont été faits dans des récipients en pyrex. Avant la stérilisation finale nous ajoutons des billes de verre dans les milieux destinés à êtreensemencés. Ces billes facilitent l'agitation et l'homogénéisation des cultures.

g) *Répartition des milieux à ensemen*c*er.* — Lorsqu'on veut simplement suivre numériquement la multiplication du bacille pyocyanique dans un milieu donné, il est préférable de répartir celui-ci, par fractions de 100 centimètres cubes, dans des fioles coniques en pyrex de 250 centimètres cubes. On obtient ainsi une quantité convenable de liquide, la surface libre est suffisamment grande et l'agitation est facile grâce aux perles de verre. Si, au contraire, on veut étudier la composition chimique du liquide de culture, on aura avantage à utiliser une grande quantité de milieu. On répartira donc celui-ci, à la dose de 400 centimètres cubes, dans des matras de 1 litre.

Quand la préparation de nos milieux est complètement terminée, nous attendons 2 ou 3 jours pour laisser au bouchon de coton le temps de sécher complètement. On en flambe alors la partie supérieure et on le recouvre d'une capsule d'étain. On évite ainsi la concentration des solutions par évaporation et, dans ces conditions, la contamination par des moisissures, au cours de la conservation, est tout à fait exceptionnelle.

Nous avons adopté, pour la préparation de nos milieux, les techniques suivantes.

Eau peptonée simple. — On prend :

Peptone bactériologique BYLA	10 grammes
Eau distillée.	1 000 grammes

On fait dissoudre la peptone dans l'eau en chauffant doucement et en agitant continuellement. On porte ensuite la solution à l'ébullition et on maintient celle-ci pendant une minute environ.

Après refroidissement on ajuste à pH 7,0 au moyen de lessive de soude diluée. On complète ensuite au volume initial, diminué de la quantité utilisée pour l'alcalinisation, au moyen d'eau distillée.

Il ne reste plus qu'à filtrer, répartir et stériliser pendant 20 minutes à 115°.

Eau peptonée salée. — Elle ne diffère de la précédente que par l'addition de 5 grammes de chlorure de sodium par litre. On fait dissoudre celui-ci en même temps que la peptone et on termine la préparation comme dans le cas précédent.

Première macération de viande. — Prendre :

Tranche de bœuf, maigre, dégraissée et hachée.	1 000 grammes
Eau distillée.	2 000 grammes

La viande est hachée et mise à macérer dans l'eau froide dès son arrivée au laboratoire. On laisse la macération se poursuivre pendant 24 heures, à la température ordinaire, en agitant de temps en temps. On exprime le tout dans un linge et on obtient ainsi un liquide rouge, dont le volume est égal ou légèrement supérieur à la quantité d'eau utilisée. On réunit tout le liquide dans un récipient dit « pot-au-feu » et on porte à l'ébullition en agitant continuellement. L'ébullition doit être maintenue pendant 2 à 3 minutes de façon à bien coaguler les albumines. Le liquide est ensuite filtré sur un papier mouillé de façon à éliminer les matières grasses.

Le coagulum, assez volumineux, resté sur le filtre est lavé à l'eau distillée et on utilise les eaux de lavage pour compléter au volume initial (2 litres) le premier filtrat.

Le liquide ainsi obtenu est limpide et très faiblement coloré en jaune. Lorsqu'il est suffisamment refroidi on l'ajuste à pH 7,0, au moyen de lessive de soude diluée, et on le porte une première fois à l'autoclave à 120° pendant 15 minutes de façon à précipiter les sels terreux.

Au sortir de l'autoclave le liquide est filtré chaud sur un filtre ébulliant et on le répartit définitivement. Il ne reste plus qu'à le stériliser pendant 20 minutes à 115°. On obtient ainsi un milieu limpide, ambré, le chauffage ayant pour effet d'accentuer la coloration primitive.

Ce milieu est analogue à celui proposé par L. GRIMBERT (89) sous le nom de *bouillon simple*. Il s'en différencie par le fait qu'après ébullition on ramène au volume primitif et par l'introduction des nouvelles méthodes d'alcalinisation.

Deuxième macération de viande. — La viande exprimée, ayant servi à la préparation de la première macération, et correspondant à 1 000 grammes de viande fraîche, est mise à macérer dans deux litres d'eau distillée.

On prolonge l'opération pendant 24 heures, à la température du laboratoire, et en agitant de temps en temps. Quand la macération est terminée on exprime le tout dans un linge et on complète à deux litres, si cela est nécessaire, par addition d'eau distillée.

Le liquide rougeâtre ainsi obtenu est porté à l'ébullition, comme dans le cas précédent, pour coaguler les albumines, on filtre sur un filtre mouillé et on complète toujours à deux litres avec les eaux de lavage du coagulum formé. Celui-ci est d'ailleurs beaucoup moins important que pour la première macération de viande. On termine ensuite la préparation comme précédemment.

On obtient ainsi un liquide limpide presque incolore.

Bouillon peptoné salé. — Prendre :

Première macération de viande stérilisée.. . . .	1 000 grammes
Peptone bactériologique BYLA.	10 grammes
Chlorure de sodium.	5 grammes

Faire dissoudre la peptone et le chlorure de sodium dans la macération en chauffant légèrement et en agitant continuellement.

Ajuster à pH 7,0 avec de la lessive de soude diluée à 10 pour 100 et porter à 120° pendant un quart d'heure pour précipiter les sels terreux. Filtrer chaud sur un filtre préalablement ébouillanté, répartir définitivement et stériliser à 115° pendant 20 minutes.

Le bouillon ainsi obtenu est limpide et jaune clair. Dans un volume déterminé il renferme, à la fois, les éléments nutritifs contenus dans le même volume de première macération de viande et les éléments nutritifs contenus dans un volume égal d'eau peptonée salée. En réalité, la quantité de substances dissoutes dans le bouillon peptoné salé est toujours un peu supérieure à la somme des quantités de substances présentes séparément dans les deux autres milieux, la stérilisation à l'autoclave provoquant toujours une légère concentration des liquides mis en œuvre.

Bouillon à l'extrait de viande Liebig. — Ce milieu a l'avantage d'être rapidement préparé mais il présente parfois une teneur en sel assez élevée. Pour le préparer prendre :

Extrait de viande LIEBIG.	10 grammes
Peptone bactériologique BYLA.	20 grammes
Chlorure de sodium.	5 grammes
Eau distillée.	1 000 grammes

Faire dissoudre l'extrait de viande, la peptone et le chlorure de sodium dans l'eau distillée en chauffant doucement et en agitant constamment. Laisser refroidir et ajuster à pH 7,0 avec de la lessive de soude diluée. Porter le liquide à l'autoclave à 120° pendant un quart d'heure, filtrer le bouillon chaud sur un filtre préalablement passé à l'eau bouillante, répartir et stériliser à 115° pendant 20 minutes.

On obtient ainsi un liquide jaune brun, fortement coloré, qui, le plus souvent limpide, peut parfois rester légèrement opalescent.

Bouillon Martin. — Ce bouillon est obtenu en mélangeant, à parties égales, une solution de peptone, obtenue par autodigestion d'estomac de porc, et une macération de viande faite à 37°.

1° *Solution de peptone.*

Estomac de porc dégraissé et haché.	200 grammes
Acide chlorhydrique pur.	10 cm ³
Eau distillée.	1 000 grammes

Placer l'eau distillée dans une capsule de porcelaine, chauffer jusqu'à ce que la température atteigne 50°, ajouter l'acide chlorhydrique, l'estomac de porc et porter le tout à l'éluve à 37°. Laisser macérer pendant 24 heures à cette température en agitant à différentes reprises. Au bout de ce temps presque tout l'estomac a été solubilisé et il ne reste plus que quelques débris flottant à la surface du liquide. Transvaser le tout dans des matras en pyrex, chauffer à l'autoclave pendant une demi-heure, en vapeur fluente, pour détruire la pepsine et passer sur un coton.

On neutralise ensuite le liquide chaud, au moyen de lessive de soude, jusqu'à virage au bleu du papier de tournesol. Il ne reste plus qu'à filtrer au papier et à stériliser le liquide ainsi obtenu, pendant 20 minutes à 115°, pour assurer sa conservation.

La solution de peptone étant toujours riche en matières grasses, on a avantage, pour obtenir un liquide clair et filtrant facilement, à attendre que le liquide soit presque froid avant de le filtrer au papier.

Dans le bouillon MARTIN ordinaire la solution de peptone est obtenue par une macération de 12 à 24 heures à 50°. Nous avons fait notre macération à 37°, température donnée par l'éluve à culture.

2° *Macération de viande.*

Tranche de bœuf, maigre, dégraissée et hachée.	1 000 grammes
Eau distillée.	2 000 grammes

L'eau distillée étant portée à la température de 37°, on ajoute la viande et on porte le mélange dans l'éluve à 37°. On laisse la macération se poursuivre pendant 24 heures en agitant de temps en temps, on exprime ensuite la viande dans un linge et on porte le liquide à l'ébullition, pendant deux ou trois minutes, pour coaguler les albumines. On filtre alors le mélange sur un filtre mouillé pour éliminer les matières grasses et on ramène le filtrat à deux litres par addition d'eau distillée. Pour éviter de perdre une petite quantité de substances nutritives on utilisera d'abord cette eau pour laver le coagulum resté sur le filtre. Il ne reste plus qu'à stériliser le liquide ainsi obtenu pendant 20 minutes à 115° pour assurer sa conservation.

Il est à remarquer que, lorsqu'on porte à l'ébullition une macération de viande faite à 37°, le liquide ne cherche pas à s'élever comme quand on chauffe une macération préparée à la température ordinaire. De plus le coagulum formé dans le premier cas est moins abondant et beaucoup plus granuleux que le coagulum obtenu dans le second cas. Nous verrons d'ail-

leurs, plus loin, que ces deux liquides n'ont pas la même tension superficielle.

3° *Mélange final.* — On ajoute un volume de solution de peptone à un volume égal de macération de viande. Le mélange obtenu est en général très peu acide (pH 6,6 à 6,8), on l'additionne de 2^{gr},50 de chlorure de sodium par litre et on l'ajuste à pH 7,0 par addition de lessive de soude diluée.

Un premier chauffage de 15 minutes à 120° provoque la formation d'un léger précipité, on filtre le liquide chaud sur un filtre ébouillanté et on vérifie que le pH n'a pas varié. S'il y a eu une légère acidification on ajoutera un peu de lessive de soude diluée pour revenir à la neutralité. Il ne reste plus qu'à répartir et à stériliser définitivement pendant 20 minutes à 115°.

Milieux synthétiques. — Il nous a semblé utile de joindre aux liquides complexes que nous venons de décrire des milieux chimiquement définis. Parmi ceux qui conviennent au développement du bacille pyocyanique, nous avons choisi les deux milieux de E. AUBEL (6) et de A. LIOR (128) qui sont des modifications des milieux conçus d'abord par GESSARD. Ces auteurs, à vrai dire, n'ont pas insisté tant sur la multiplication du bacille pyocyanique que sur la formation du pigment caractéristique. Leurs recherches ne les ont pas conduits à traduire par des chiffres l'abondance du développement microbien cependant, d'après eux, ces milieux doivent permettre une bonne multiplication microbienne.

Les milieux proposés par ces auteurs étant normalement acides, nous les avons ramenés à pH 7,0, par addition de solution normale de soude. En outre la stérilisation a été faite par tyndallisation à la température de 100°.

La préparation de ces milieux, ainsi modifiés par nous, est la suivante :

1° *Milieu de AUBEL ajusté à pH 7,0 :*

Asparagine.	2 ^{gr} ,50
Sulfate de magnésium.. . . .	0 ^{gr} ,50
Phosphate monopotassique pur.	1 ^{gr}
Eau distillée q. s. pour.	500 cm ³

On fait dissoudre les sels dans l'eau chaude et on obtient ainsi un liquide limpide, incolore, dont le pH est inférieur à 6,0. Par addition de 4^{cm}³,6 de solution normale de soude, on amène ce milieu à pH 7,0. Il ne reste plus qu'à le répartir et à le stériliser pendant 1 heure en vapeur fluente. On répète ce chauffage trois fois de suite à 24 heures d'intervalle. Dans ces conditions la concentration à l'autoclave est tout à fait négligeable, la solution reste claire, incolore mais il s'y forme cependant quelques cristaux allongés.

2° *Milieu de LIOR ajusté à pH 7,0 :*

Phosphate mono-acide de sodium pur (PO ⁴ Na ² II + 12H ² O).	2 ^{gr} ,50
Sulfate de magnésium pur (SO ⁴ Mg + 7H ² O).	1 ^{gr} ,25
Succinate d'ammonium.	1 ^{gr} ,25
Eau distillée q. s. pour.	500 cm ³

La dissolution des sels est assez rapide, le pH est alors égal à 6,0. On ajoute au liquide 3^{cm}³,6 de la solution normale de soude, de façon à amener le pH à 7,0. Le milieu est ensuite réparti et stérilisé en vapeur fluente par trois chauffages de une heure exécutés à 24 heures les uns des autres. On obtient finalement un liquide incolore mais dans lequel s'est formé un précipité blanc, granuleux, léger et assez abondant.

Ce précipité est moins important lorsqu'on utilise simplement, sans alcalinisation, la formule de Lior. Dans les mêmes conditions, le milieu de AUBEL ne donne naissance à aucune cristallisation.

Bouillon gélosé. — Le bouillon gélosé, servant à la conservation des souches microbiennes ou à la numération des bacilles capables de se multiplier sur plaque de gélose, a été préparé de la façon suivante :

30 grammes de gélose sèche coupée en petits fragments, sont mis à macérer dans l'eau pendant une heure environ. Quand la gélose est suffisamment gonflée, on l'exprime, on la place dans un récipient renfermant déjà 1 litre de bouillon à l'extrait de viande LIEBIG, et on en fait dissoudre la plus grande partie en portant le mélange à 80 ou 85° et en maintenant cette température pendant une dizaine de minutes, tout en agitant continuellement. Au bout de ce temps, on ramène le mélange à pH 7,0, si cela est nécessaire, puis on le porte à l'autoclave à 120° pendant 45 minutes pour achever la solubilisation de la gélose. Au sortir de l'autoclave le liquide est filtré sur un filtre Chardin préalablement passé à l'eau bouillante. La filtration est plus rapide lorsqu'on l'effectue dans l'autoclave chaud et ouvert. Il ne reste plus qu'à vérifier la réaction du liquide filtré, puis à répartir celui-ci et à le stériliser définitivement à 115° pendant vingt minutes.

MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS CES DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE

Mode opératoire utilisé. — Tous nos ensemencements ont été répétés deux fois en utilisant pour cela deux fractions identiques d'un même « lot » de milieu. Nous avons employé, pour nos essais, la technique suivante :

1° *Conservation de la souche microbienne.* — La souche utilisée dans toutes nos expériences était constituée par un bacille pyocyanique typique provenant de l'Institut Pasteur et correspondant à la race A de GESSARD (81). Nous l'avons toujours conservée sur gélose inclinée préparée avec le bouillon à l'extrait de viande LIEBIG. Les repiquages servant à l'entretien étaient effectués tous les mois ; après un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°, la nouvelle culture était conservée dans un lieu frais et à l'abri de la lumière. Pour tous nos ensemencements nous avons toujours utilisé une culture âgée de 24 heures et développée à l'étuve à 37°.

Le choix du bacille pyocyanique nous procure différents avantages. Ce

microbe pousse rapidement, il est mobile, ses cellules filles se séparent facilement et ne produisent que très peu de ces longues chaînes qui, gênantes dans la numération directe, causent des erreurs très importantes dans les numérations par ensemencement. Sa forme est nette et ses dimensions sont assez grandes. Il est également anaérobie facultatif et donne des colonies très visibles même à l'intérieur de nos plaques de gélose. La nutrition du bacille pyocyanique a été bien étudiée, c'est un microbe peu exigeant, qui pousse bien dans différents milieux artificiels où, comme J. GALIMARD et L. LACOMME (78) l'ont montré, il peut se contenter d'un seul acide aminé. Enfin son pigment très spécial permet de le caractériser avec certitude et lui donne un intérêt particulier.

2° *Préparation de l'émulsion microbienne.* — La suspension destinée à faire l'ensemencement est préparée en émulsionnant deux anses de la masse microbienne dans 9 centimètres cubes d'une solution stérilisée de chlorure de sodium à 8 pour 1 000. On a soin d'éviter les amas bactériens et d'agiter vivement le mélange, en présence de billes de verre, pour obtenir une suspension bien homogène. On obtient ainsi une émulsion renfermant de 600 000 000 à 1 000 000 000 de germes par centimètre cube. La masse microbienne est recueillie en raclant très légèrement la surface de la gélose ensemencée, avec l'anse de platine, jusqu'à ce que celle-ci soit fortement chargée de corps microbiens.

3° *Numération de l'émulsion microbienne.* — Nous utilisons pour cela la méthode de numération microscopique comparative que nous avons exposée au chapitre premier. On obtiendra de bons résultats en mélangeant, pour faire l'étalement, 1 centimètre cube d'émulsion microbienne à 1 centimètre cube de suspension titrée de levure. D'une façon générale la préparation de l'émulsion, la coloration et la numération proprement dite ne dépassent guère une durée de 1 h. 1/2. Pendant ce temps la suspension microbienne est conservée à la température ordinaire et à l'abri de la lumière. Comme nous l'avons déjà dit, on a intérêt à ne pas prolonger inutilement la durée de cette opération, certains auteurs : A. DUTHOIT (57), WINSLOW et BROOKE (192), etc., ayant mis en évidence l'action nocive de l'eau distillée ou de l'eau distillée salée sur les bactéries. Il semblerait d'ailleurs, si l'on se reporte aux expériences de SHERMAN et ALBUS (176), que cette action s'exerce surtout sur des bacilles prélevés au début de la phase logarithmique.

4° *Ensemencement.* — Toutes nos cultures ont été faites à partir d'un ensemencement initial de 500 000 germes visibles par centimètre cube. Connaissant le volume à ensemencer et le titre de l'émulsion microbienne, il est facile de calculer le volume de suspension bactérienne à ajouter au milieu à étudier pour obtenir cette concentration. L'émulsion ayant été rendue homogène par une nouvelle agitation, on en prélève une quantité convenable au moyen d'une pipette stérile, graduée en 1/100 de centimètre cube, et on verse cette fraction dans le milieu déjà porté à 37° par un séjour de quelques heures dans l'étuve à culture. Aussitôt après l'ense-

mencement on agite bien le liquide, on procède à la numération des bacilles capables de se multiplier sur gélose (temps 0) et on porte la culture à l'étuve à 37°.

5° *Séjour à l'étuve.* — Pendant la première journée de séjour à l'étuve il est inutile de recouvrir le col des récipients d'une capsule d'étain. On facilite ainsi le renouvellement de l'air et la concentration par évaporation est nulle. On peut d'ailleurs s'en assurer par des pesées successives. Si le séjour se prolonge, on capsulera au contraire les vases de culture, et le renouvellement de l'air intérieur se fera au moment des prélèvements. Pendant la durée de l'expérience les cultures doivent être agitées fréquemment. Le bacille pyocyanique forme en effet des voiles parfois assez difficiles à dissocier complètement, des agitations trop peu nombreuses ou insuffisantes laisseraient subsister des portions importantes de ceux-ci et provoqueraient des erreurs par défaut considérables. On ne devra donc pas se contenter de remuer circulairement le liquide, ce qui produirait simplement des mouvements réguliers de la masse entière, mais procéder à des agitations vives dans tous les sens, ce qui provoque des mouvements irréguliers et rapides des billes de verre qui brassent le liquide.

Enfin, lorsque nous avons opéré sur de grosses quantités de liquide (400 centimètres cubes), et que nous n'avons pas fait des prélèvements nombreux au cours de la culture, nous avons cependant agité et débouché fréquemment nos matras pour permettre le renouvellement facile de l'air intérieur.

Nos prélèvements ont été particulièrement nombreux pendant les premiers jours de la culture qui correspondent à la période active de la multiplication microbienne. Avant de résumer les résultats que nous avons obtenus en étudiant la multiplication bactérienne dans les différents milieux, nous exposerons en détail une de nos expériences se rapportant à la culture du bacille pyocyanique dans la première macération de viande.

Etude détaillée d'une multiplication microbienne. — *Multiplication du bacille pyocyanique dans la première macération de viande.* — Nous ne reviendrons pas sur les méthodes de numération qui ont été exposées au chapitre premier.

L'émulsion de levure renfermait 270 000 000 de cellules par centimètre cube.

En étalant, sur 4 lames, un mélange à parties égales de suspension de levure et d'émulsion microbienne, et en procédant à la numération comparative des deux sortes d'éléments, on trouve 842 bacilles pour 375 levures.

L'émulsion microbienne, préparée pour l'ensemencement, renferme donc : $270.000.000 \times \frac{842}{375} = 606\,000\,000$ de germes par centimètre cube.

Nous voulons semer 100 centimètres cubes de milieu à raison de 500 000 bacilles visibles par centimètre cube. Il faudra donc

prélever un volume de suspension microbienne renfermant au total $500\,000 \times 100 = 50\,000\,000$ de bactéries. Ce volume est égal à

$$\frac{1\text{ cm}^3 \times 50}{606} = 0\text{ cm}^3,08.$$

On retire donc de l'étuve le milieu à ensementer, on y ajoute $0\text{ cm}^3,08$ de l'émulsion microbienne, préalablement rendue homogène, on agite vivement pendant trois ou quatre minutes et on prélève 1 centimètre cube du mélange pour procéder à la numération des bacilles capables de se multiplier sur gélose. Cette prise d'essai est versée dans une fiole renfermant 100 centimètres cubes de sérum physiologique, la culture est reportée à l'étuve à 37° , et on note l'heure du début de l'expérience (temps 0). La première dilution à $1/100$ est agitée vivement, et on en porte 1 centimètre cube dans une seconde fiole renfermant 100 centimètres cubes d'eau salée. C'est avec 1 centimètre cube de cette seconde dilution à $1/10\,000$ qu'on ensementera chacun des 3 tubes de gélose avant de les couler en boîte de PÉTRI. Au bout de 3 jours on procède à la numération des colonies développées sur les plaques de gélose et on trouve 13, 16 et 11. La moyenne étant égale à $\frac{13 + 16 + 11}{3} = 13,3$, le milieu ensementé ren-

fermait au temps 0 : $13,3 \times 10\,000 = 133\,000$ bacilles capables de se reproduire par centimètre cube. Pour la numération des boîtes de PÉTRI, il ne faut pas oublier que, tandis que les colonies développées à la surface de la gélose présentent des dimensions variables et une coloration verte, celles qui ont pris naissance à l'intérieur du milieu solidifié ont un aspect en navette et une couleur noire.

I. En résumé *au temps 0* nous avons :

- a) bacilles visibles par cm^3 : $500\,000$ (apportés par l'ensemencement);
- b) bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée.	100×100
Nombre des colonies sur boîte de PÉTRI.	$13 + 16 + 11$
Moyenne des colonies sur boîte de PÉTRI.	$\frac{13 + 16 + 11}{3} = 13,33$
Nombre de bacilles capables de se reproduire par cm^3	$133\,000$

Nous faisons un second prélèvement au bout de 2 heures et demie. Le milieu est encore limpide. Nous en prélevons 1 centimètre cube, que nous mélangeons à 1 centimètre cube d'émulsion de levure pour la numération des microbes visibles, et un autre centimètre cube pour la numération des bacilles capables de se multiplier. Nous avons alors :

II. *Culture âgée de 2 heures et demie.*

a) bacilles visibles : 1 centimètre cube de liquide + 1 centimètre cube d'émulsion de levure;

$$\begin{array}{l} 39 \text{ bacilles observés pour. } 1\,699 \text{ levures} \\ \text{d'où bacilles visibles par cm}^3. \quad \frac{270\,000\,000 \times 39}{1\,699} = 6\,197\,000. \end{array}$$

b) bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée.	100 × 100
Nombre des colonies sur boîte de PÉTRI.	21 + 16 + 15
Moyenne des colonies sur boîte de PÉTRI.	$\frac{52}{3} = 17,3$
d'où bacilles capables de se reproduire par cm ³ : . .	173 000.

Les numérations se poursuivent ensuite d'une façon analogue. Pour la commodité des lectures on remplace parfois, dans la série des dilutions, une fiole de 100 centimètres cubes de sérum physiologique par un tube de 9 centimètres cubes d'eau salée, ce qui donne une dilution à 1/10, et, à partir de la 24^e heure, la numération comparative des microbes visibles est faite avec une dilution également à 1/10 de la culture primitive. On obtient ainsi les nombres suivants :

III. *Culture âgée de 5 heures.* — Liquide encore clair, un peu moins limpide qu'un témoin.

a) bacilles visibles : 1 centimètre cube de culture + 1 centimètre cube d'émulsion de levure :

72 bacilles observés pour.	784 levures
d'où bacilles visibles par cm ³ :	$270\ 000\ 000 \times \frac{72}{784} = 24\ 795\ 000.$

b) bacilles capables de se reproduire :

Dilutions utilisées :	10 × 100 × 100
Nombre des colonies sur boîte de PÉTRI.	23 + 23 + 35
Moyenne des colonies sur boîte de PÉTRI.	$\frac{81}{3} = 27$
d'où bacilles capables de se reproduire par cm ³ : . .	2 700 000.

IV. *Culture âgée de 7 heures et demie.* — Milieu légèrement trouble.

a) bacilles visibles : 1 centimètre cube de culture + 1 centimètre cube d'émulsion de levure :

182 bacilles observés pour.	714 levures
d'où bacilles visibles par cm ³ :	$270\ 000\ 000 \times \frac{182}{714} = 68\ 820\ 000.$

b) bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée.	100 × 100 × 100
Nombre des colonies sur boîte de PÉTRI.	28 + 32 + 25
Moyenne des colonies sur boîte de PÉTRI.	$\frac{85}{3} = 28,33$
d'où bacilles capables de se reproduire par cm ³ : . . .	28 330 000.

V. *Culture âgée de 31 heures et demie.* — Milieu jaunâtre, très trouble, voile à la surface.

a) bacilles visibles : 1 centimètre cube de culture diluée à 1/10 + 1 centimètre cube d'émulsion de levure :

742 bacilles observés pour.	470 levures
d'où bacilles visibles par cm ³ :	$270\ 000\ 000 \times \frac{742}{470} \times 10 = 4\ 262\ 000\ 000.$

b) bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée.	$100 \times 100 \times 100 \times 100$
Nombre des colonies sur boîte de PÉTRI.	$35 + 22 + 39$
Moyenne des colonies sur boîte de PÉTRI.	$\frac{96}{3} = 32$
d'où bacilles capables de se reproduire par cm^3 :	3 200 000 000.

VI. *Culture âgée de 54 heures.* — Liquide jaune verdâtre, très trouble, voile à la surface.

a) bacilles visibles : 1 centimètre cube de culture diluée à 1/10 + 1 centimètre cube d'émulsion de levure :

1 033 bacilles observés pour.	292 levures
d'où bacilles visibles par cm^3 :	$270\ 000\ 000 \times \frac{1\ 033}{292} \times 10 = 9\ 551\ 000\ 000.$

b) bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée.	$100 \times 100 \times 100 \times 100$
Nombre des colonies sur boîte de PÉTRI.	$50 + 44 + 69$
Moyenne des colonies sur boîte de PÉTRI.	$\frac{163}{3} = 54,33$
d'où bacilles capables de se reproduire par cm^3 :	5 433 000 000.

VII. *Culture âgée de 4 jours.* — Liquide trouble de couleur verdâtre, pas de voile.

a) bacilles visibles : 1 centimètre cube de culture diluée à 1/10 + 1 centimètre cube d'émulsion de levure :

978 bacilles pour.	305 levures
d'où bacilles visibles par cm^3 :	$270\ 000\ 000 \times \frac{978}{305} \times 10 = 8\ 657\ 700\ 000.$

b) bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée.	$10 \times 100 \times 100 \times 100$
Nombre des colonies sur boîte de PÉTRI.	$167 + 175 + 148$
d'où bacilles capables de se reproduire par cm^3 :	1 633 000 000.

VIII. *Culture âgée de 7 jours.* — Liquide trouble, verdâtre, pas de voile.

a) bacilles visibles : 1 centimètre cube de culture diluée à 1/10 + 1 centimètre cube d'émulsion de levure ;

877 bacilles pour.	343 levures
d'où bacilles visibles par cm^3 :	$270\ 000\ 000 \times \frac{877}{343} \times 10 = 6\ 903\ 000\ 000.$

b) bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée.	$10 \times 100 \times 100 \times 100$
Nombre des colonies sur Boîte de PÉTRI.	$103 + 116 + 107$
d'où bacilles capables de se reproduire par cm^3 :	1 086 000 000.

IX. *Culture âgée de 11 jours.* — Liquide trouble, jaune verdâtre.

a) bacilles visibles : 1 centimètre cube de culture diluée à 1/10 + 1 centimètre cube de levure.

725 bacilles pour.	234 levures
d'où bacilles visibles par cm^3 :	$270\ 000\ 000 \times \frac{725}{234} \times 10 = 8\ 365\ 000\ 000.$

b) bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée..	10 × 100 × 100
Nombre des colonies sur boîte de PÉTRI.. . . .	2 320 + 2 344
d'où bacilles capables de se reproduire par cm ³ :.. . . .	233 200 000.

X. Culture âgée de 18 jours. — Liquide trouble, rouge verdâtre.

a) bacilles visibles : 1 centimètre cube de culture diluée à 1/10 + 1 centimètre cube de levure.

677 bacilles pour.. . . .	272 levures
d'où bacilles visibles par cm ³ :.. . . .	$270\ 000\ 000 \times \frac{677}{272} \times 10 = 6\ 720\ 000\ 000.$

b) bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée..	100 × 100
Nombre des colonies sur boîte de PÉTRI.. . . .	1 325 + 1 350 + 1 270
d'où bacilles capables de se multiplier par cm ³ :.. . . .	13 150 000.

A partir de ce moment, la numération des bacilles visibles devient très difficile par suite de la présence de débris de toutes sortes (précipités divers ou bacilles partiellement autolysés et prenant le colorant d'une façon très variable). On se contentera donc de dénombrer les bacilles capables de se reproduire sur gélose.

XI. Culture âgée de 25 jours. — Liquide trouble, toujours rouge-verdâtre.

bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée..	100 × 100
Nombre des colonies sur boîtes de PÉTRI.. . . .	675 + 745 + 787
d'où, par cm ³ :.. . . .	7 356 000 bacilles.

XII. Culture âgée de 32 jours. — Liquide trouble, rougeâtre ;
bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée..	100 × 100
Nombre des colonies..	573 + 589 + 498
d'où, par cm ³ :.. . . .	5 533 000 bacilles.

XIII. Culture âgée de 39 jours : Liquide trouble, rougeâtre ;
bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée..	100 × 100
Nombre des colonies..	448 + 400 + 381
d'où, par cm ³ :.. . . .	4 096 000 bacilles.

A partir de ce moment on cesse la numération proprement dite, et on vérifie seulement la vitalité de la culture en en prélevant quelques gouttes, à l'aide d'une pipette Pasteur, et en les ensemençant sur gélose inclinée. En cas de résultat positif on vérifie, au microscope, que la culture ainsi obtenue sur gélose est constituée uniquement par du bacille pyocyanique.

Nous avons ainsi constaté que notre macération, au bout de 164 jours de séjour à l'étuve à 37°, donnait encore des repiquages très riches et se multipliant rapidement.

Multiplication du bacille pyocyanique dans l'eau peptonée simple et dans l'eau peptonée salée.

Nous avons commencé nos recherches en étudiant la multiplication du bacille pyocyanique dans les milieux les plus simples utilisés en bactériologie, c'est-à-dire dans l'eau peptonée simple et dans l'eau peptonée salée. En comparant la multiplication microbienne dans ces deux liquides, nous nous rendrons compte si l'addition de chlorure de sodium aux bouillons de culture, addition courante en bactériologie, est justifiée dans le cas qui nous occupe. En effet, tandis que A. BERTHELOT, G. RAMON et M^{lle} AMOUREUX (14) constatent que la production de la toxine tétanique est favorisée par une addition de 7^{gr},50 de chlorure de sodium par litre de bouillon, S. SCHMIDT (169) trouve que la formation de la toxine diphtérique dans le bouillon MARTIN n'est pas influencée par la quantité de sel ajouté. Nous verrons d'ailleurs au chapitre suivant que, du fait même de sa préparation, ce bouillon est suffisamment riche en chlorure de sodium et qu'il est sans doute inutile de lui en ajouter une nouvelle fraction. En étudiant la croissance de différentes bactéries pathogènes sur milieu gélosé, S. SIERAKOWSKI, Z. MODRZEWSKA, H. RABINOWICZ et E. SALAMON (177), ont observé que, tandis que la multiplication de certains microbes comme le *Proteus vulgaris* est indépendante de la concentration en chlorure de sodium, le vibron cholérique se développe le mieux en présence de 5 pour 1 000 de NaCl, le bacille de Shiga-kruse préfère une concentration de 10 à 15 pour 1 000, et la multiplication du staphylocoque s'accroît à mesure qu'on élève la proportion de chlorure de sodium de 2,5 à 20 pour 1 000.

La formule donnée pour la préparation de l'eau peptonée varie d'ailleurs suivant les ouvrages. Tandis que F. BEZANÇON (21), CH. DOPTER et E. SACQUÉPÉE (53), la préparent avec 10 grammes de peptone et 5 grammes de sel marin par litre, A. CALMETTE (33) l'obtient en faisant dissoudre 20 à 30 grammes de peptone dans un litre d'eau distillée. Enfin C. GESSARD (82), pour l'identification des germes pyocyaniques, utilise une solution de peptone pancréatique à 20 pour 1 000 sans addition de chlorure de sodium.

Pour avoir des expériences comparables nous avonsensemencé, avec la même émulsion microbienne, à la fois l'eau peptonée simple et l'eau peptonée salée. Nous avons donc dans les deux milieux, aussitôt après l'ensemencement, le même nombre de bacilles identiques par centimètre cube. Les deux cultures ont évolué absolument de la même façon. Le liquide présente un louche à peine perceptible vers la 3^e heure, celui-ci devient appréciable vers la 5^e heure, et on observe à la 7^e heure un trouble assez net avec parfois la formation d'un léger voile. La culture est très trouble à partir de la 24^e heure et conserve la même opacité jusqu'à la fin de l'expérience. A partir de la 48^e heure le voile ne se reforme plus. La coloration, d'abord jaune verdâtre, passe au vert par agitation à l'air et

présente son maximum d'intensité vers la 48^e heure, elle s'atténue ensuite peu à peu et vers le 8^e jour le liquide est redevenu presque jaune. Les résultats obtenus sont groupés dans les tableaux suivants dans lesquels nous désignons sous le nom de « germes capables de se reproduire » les germes, prélevés dans un milieu liquide, et cependant capables de se reproduire sur un milieu neuf solidifié par la gélose.

MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS L'EAU PEPTONÉE SIMPLE ET DANS L'EAU PEPTONÉE SALÉE

PREMIER ENSEMENCEMENT.

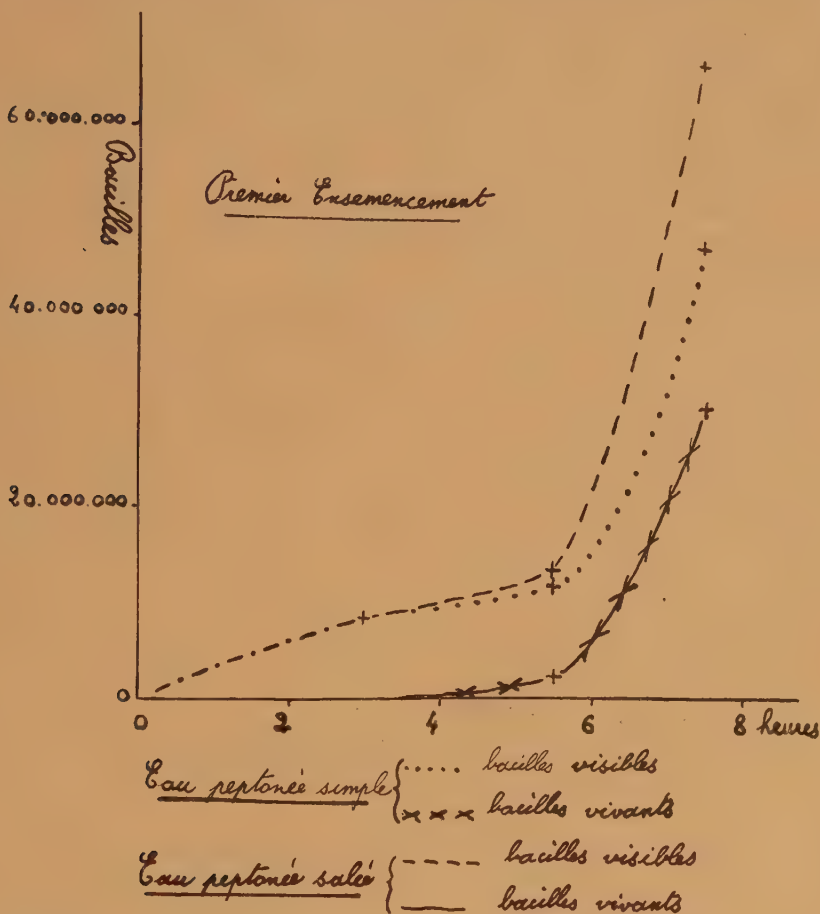
AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²)	
	Eau peptonée simple.	Eau peptonée salée.	Eau peptonée simple.	Eau peptonée salée.
0	500 000	500 000	116 600	120 000
3 heures	8 976 000	8 470 000	133 300	136 600
5 heures 30	15 957 000	17 664 000	1 760 000	2 272 000
7 heures 45	47 591 000	66 422 000	30 330 000	30 330 000
29 heures	4 970 000 000	8 818 000 000	2 633 000 000	2 400 000 000
46 heures 15	10 150 000 000	9 900 000 000	3 300 000 000	3 466 000 000

DEUXIÈME ENSEMENCEMENT.

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²)	
	Eau peptonée simple.	Eau peptonée salée.	Eau peptonée simple.	Eau peptonée salée
0	500 000	500 000	400 000	346 000
2 heures 30	9 262 000	11 210 000	673 000	1 080 000
5 heures	27 440 000	32 600 000	18 266 000	22 800 000
6 heures 50	74 550 000	100 640 000	23 660 000	46 660 000
30 heures 15	3 602 000 000	4 220 000 000	2 766 000 000	4 033 000 000
52 heures	5 680 000 000	4 351 000 000	2 800 000 000	2 366 000 000
77 heures	4 170 000 000	5 127 000 000	3 000 000 000	2 300 000 000
4 jours	4 620 000 000	4 619 000 000	1 843 000 000	1 250 000 000
6 jours	4 339 000 000	4 947 000 000	1 540 000 000	1 806 000 000
9 jours	3 039 000 000	3 180 000 000	160 000 000	86 000 000

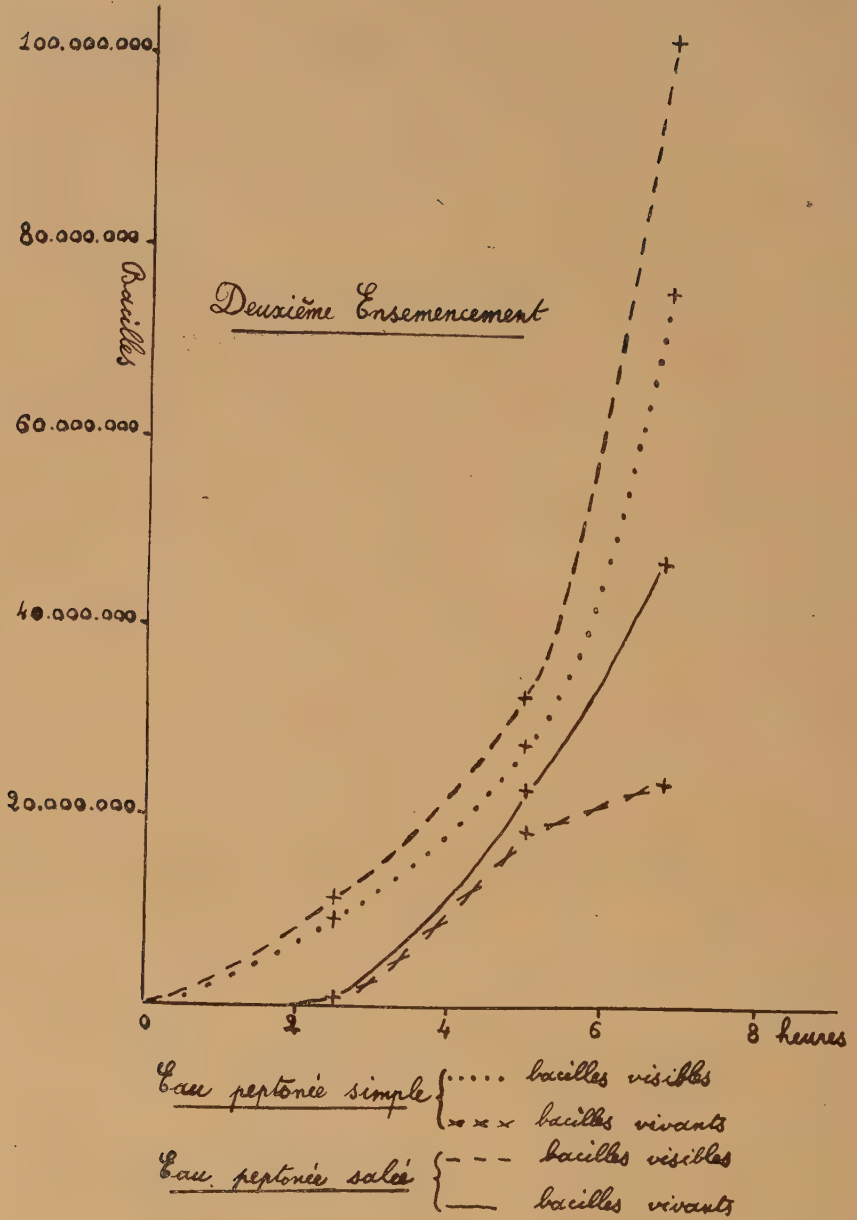
Ces chiffres seront examinés plus loin, nous pouvons cependant remarquer, dès maintenant, qu'ils sont fort réguliers. Ils peuvent servir à établir les courbes suivantes (Courbes I à IV) dans lesquelles on a porté les emps en abscisses et le nombre des germes en ordonnées. Deux courbes

sont réservées pour chaque ensemencement, l'une correspond aux premières heures de la culture tandis que l'autre résume son évolution complète. Pour ne pas surcharger la légende, nous désignons sous le terme de bacilles vivants les germes capables de se reproduire sur gélose solidifiée.

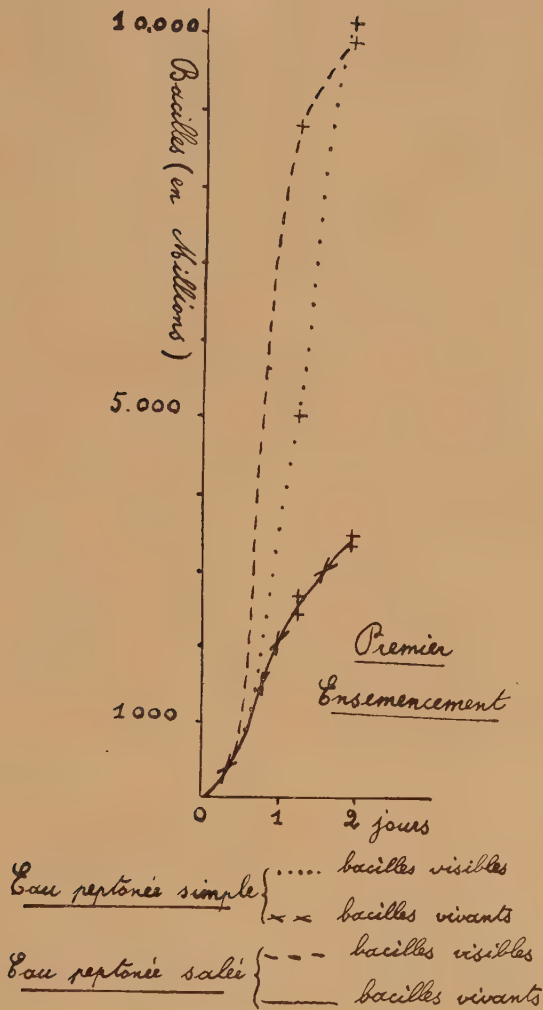


COURBE I. — Multiplication du bacille pyocyanique dans l'eau peptonée simple et dans l'eau peptonée salée. — Premières heures de la culture.

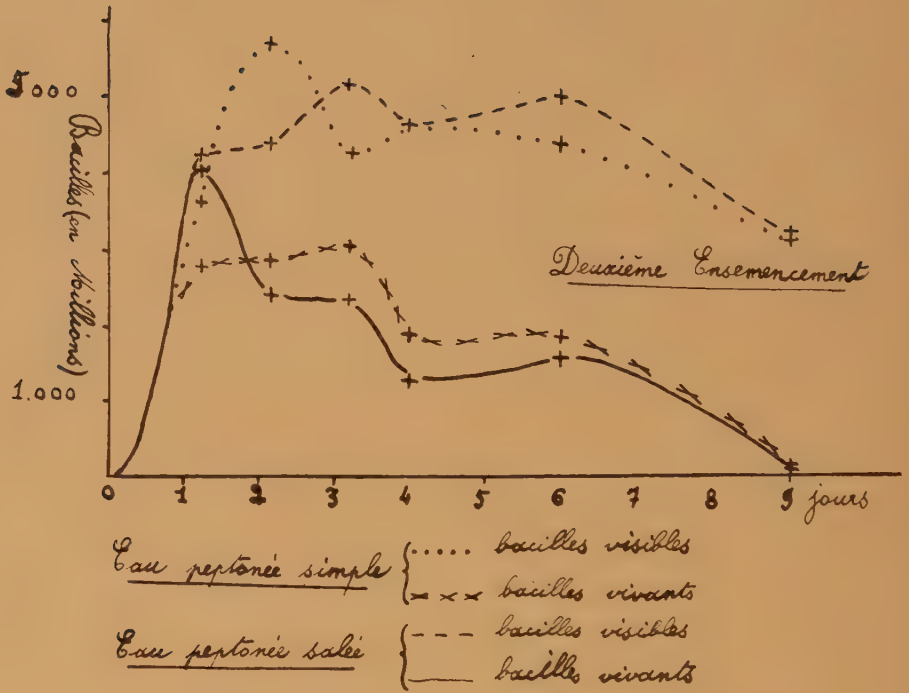
Si maintenant nous calculons les logarithmes des nombres microbiens donnés par nos expériences, nous pourrions, en partant de ces logarithmes, obtenir le nombre de bipartitions produites dans une période donnée et en déduire le temps de génération. Nous avons en effet montré, au chapitre précédent, que si l'on désigne par a le nombre des microbes à un instant donné et par b le nombre des microbes au bout d'un temps déterminé, le nombre x de bipartitions survenues pendant cette période est donné par la formule : $x = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$. Par suite le temps de génération correspondant, t , est donné par la relation $t = \frac{\text{durée de la période}}{x}$.



COURBE II. — Multiplication du bacille pyocyanique dans l'eau peptonée simple et dans l'eau peptonée salée. — Premières heures de la culture.



COURBE III. — Multiplication du bacille pyocyanique dans l'eau peptonée simple et dans l'eau peptonée salée. — Évolution de la culture.



COURBE IV. — Multiplication du bacille pyocyanique dans l'eau peptonée simple et dans l'eau peptonée salée. — Evolution de la culture.

Dans les tableaux suivants nous indiquons les logarithmes des nombres microbiens aux différentes heures de la culture, la grandeur de la période comprise entre deux prélèvements successifs, le nombre de bipartitions produites pendant cette période et le temps de génération correspondant. Deux tableaux se rapportent aux microbes visibles après coloration sur lame et deux autres concernent les microbes capables de se multiplier sur gélose solidifiée.

TEMPS DE GÉNÉRATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS L'EAU PEPTONÉE SIMPLE ET DANS L'EAU PEPTONÉE SALÉE

PREMIER ENSEMENCEMENT. MICROBES VISIBLES.

AGE DE LA CULTURE	EAU PEPTONÉE SIMPLE				EAU PEPTONÉE SALÉE			
	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.
0	5,699				5,699			
3 heures	6,953	180'	4,16	43'	6,928	180'	4,08	44'
5 h. 30	7,203	150'	0,83	180'	7,247	150'	1,06	141'
7 h. 45	7,677	135'	1,57	86'	7,822	135'	1,91	71'
29 heures	9,696	1 275'	6,7	190'	9,945	1 275'	7,3	174'
46 h. 15	10,006	1 035'	1,03	100'	9,996	1 035'	0,16	107 heures

DEUXIÈME ENSEMENCEMENT. MICROBES VISIBLES.

AGE DE LA CULTURE	EAU PEPTONÉE SIMPLE				EAU PEPTONÉE SALÉE			
	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.
0	5,699				5,699			
2 h. 30	6,966	150'	4,2	36'	7,049	150'	4,48	33',5
5 heures	7,438	150'	1,57	95'	7,513	150'	1,54	97'
6 h. 50	7,872	110'	1,44	76'	8,002	110'	1,67	66'
30 h. 15	9,556	1 405'	5,59	251'	9,625	1 405'	5,39	260'
52 heures	9,754	1 305'	0,65	33 h. 27	9,638	1 305'	0,04	543 heures
77 heures	9,620				9,710			
4 jours	9,664				9,663			
6 jours	9,637				9,694			
9 jours	9,482				9,502			

PREMIER ENSEMENCEMENT. MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE.

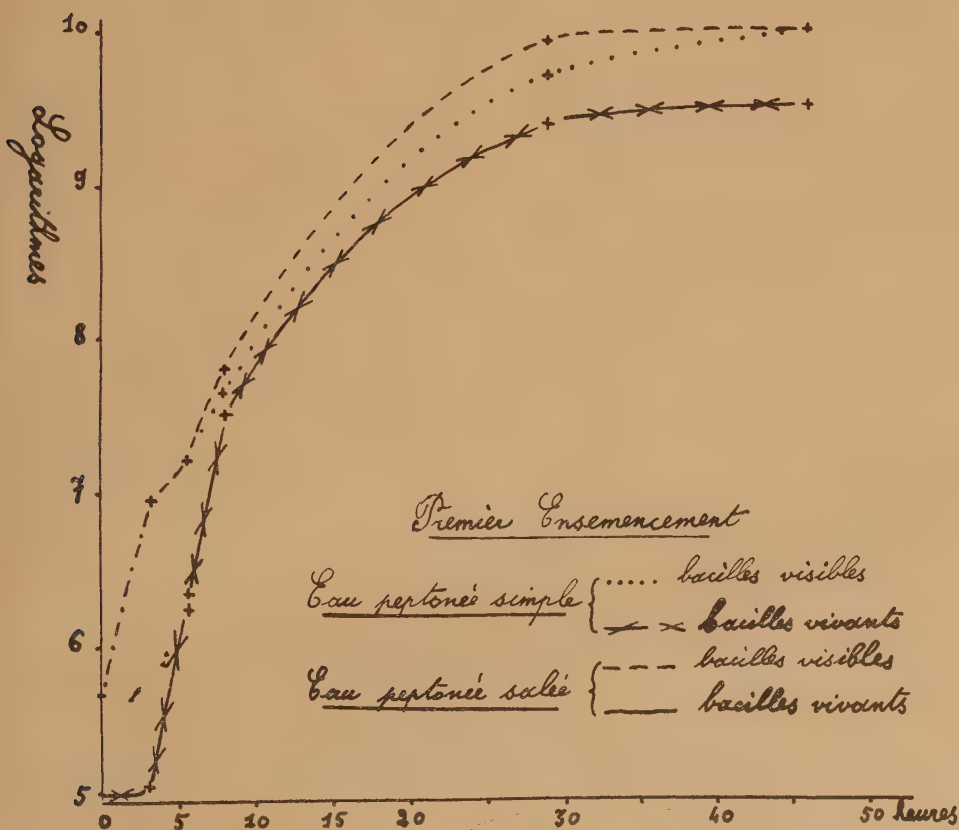
AGE DE LA CULTURE	EAU PEPTONÉE SIMPLE				EAU PEPTONÉE SALÉE			
	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.
0	5,067				5,079			
3 heures	5,125	180'	0,19	947'	5,135	180'	0,18	1 000'
5 h. 30	6,245	150'	3,72	40'	6,356	150'	4,05	37'
7 h. 45	7,482	135'	4,1	33'	7,482	135'	3,74	36'
29 heures	9,420	1 275'	6,43	198'	9,380	1 275'	6,3	202'
46 h. 15	9,518	1 035'	0,32	54 heures	9,540	1 035'	0,53	32 h. 30

DEUXIÈME ENSEMENCEMENT. MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE.

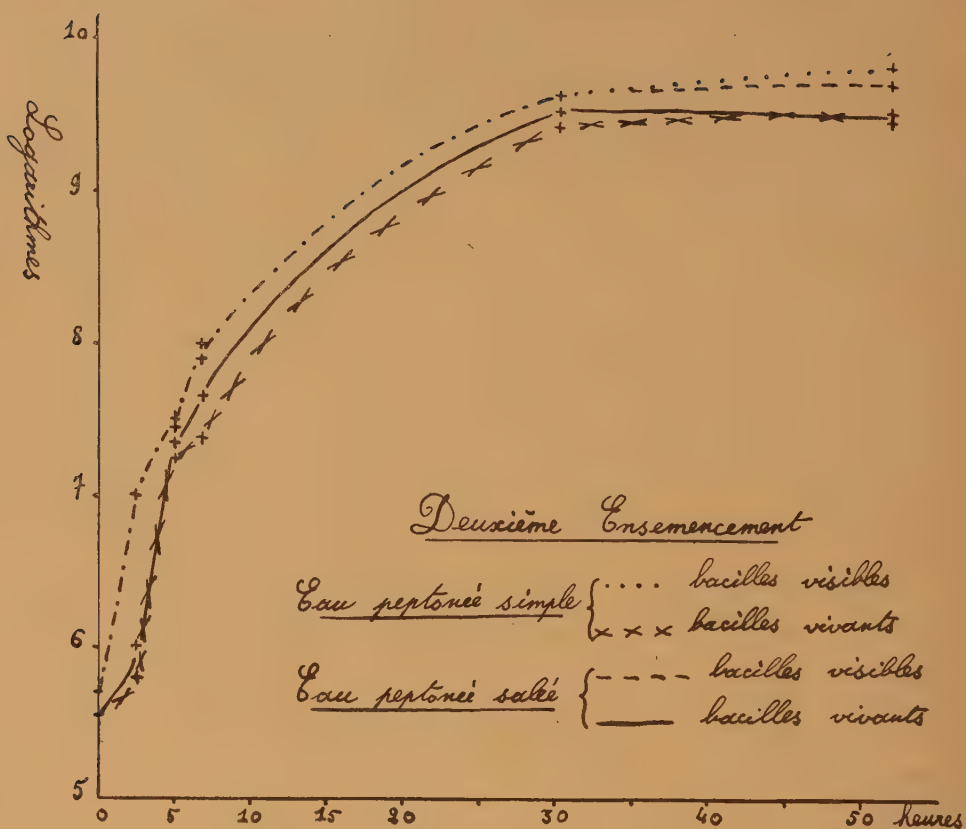
AGE DE LA CULTURE	EAU PEPTONÉE SIMPLE				EAU PEPTONÉE SALÉE			
	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.
0	5,602				5,539			
2 h. 30	5,828	150'	0,75	200'	6,033	150'	1,64	91'
5 heures	7,261	150'	4,76	31',5	7,358	150'	4,4	34'
6 h. 50	7,373	110'	0,37	297'	7,669	110'	1,03	106'
30 h. 15	9,441	1 405'	6,87	204'	9,604	1 405'	6,42	218'
52 heures	9,447	1 305'	0,02	1 083 heures	9,374			
77 heures	9,477				9,362			
4 jours	9,265				9,097			
6 jours	9,187				9,257			
9 jours	8,204				7,934			

Si nous portons maintenant, sur deux axes perpendiculaires, les logarithmes ainsi calculés en ordonnées et les temps correspondants en abscisses,

nous obtenons, pour les premiers jours de chaque ensemencement, deux séries de courbes (Courbes V et VI). Les courbes qui correspondent aux bacilles visibles présentent, dès le début, une pente maximum qui diminue ensuite peu à peu ; la multiplication des microbes visibles est donc de moins en moins rapide, comme nous pouvons d'ailleurs le remarquer en examinant les temps de génération. Au contraire les courbes se rapportant aux microbes capables de se reproduire sur gélose, présentent d'abord une partie peu inclinée, parfois presque horizontale, correspondant à la phase de latence puis, brusquement, la phase de multiplication logarithmique prend naissance, les courbes montent rapidement et peuvent présenter, comme dans le premier ensemencement par exemple, plusieurs points en ligne droite. Pendant cette période les temps de génération sont très petits. Ensuite la multiplication se ralentit graduellement et les courbes se rapprochent peu à peu de l'horizontale (phase de multiplication ralentie et phase de maximum stationnaire) avant de s'incliner en sens inverse.



COURBE V. — Multiplication du bacille pyocyanique dans l'eau peptonée simple et dans l'eau peptonée salée. — Variations des logarithmes des nombres microbiens en fonction de l'âge de la culture.



COURBE VI. — Multiplication du bacille pyocyaneus dans l'eau peptonée simple et dans l'eau peptonée salée. — Variations des logarithmes des nombres microbiens en fonction de l'âge de la culture.

Les résultats trouvés pour l'eau peptonée simple et pour l'eau peptonée salée sont, aux erreurs d'expérience près, absolument semblables. Il n'y a aucune différence dans le nombre des microbes observés, la durée de la phase de latence ou la valeur du temps de génération. L'addition de 5 grammes pour 1 000 de chlorure de sodium à l'eau peptonée, qui renferme déjà une petite quantité de chlorures, est donc sans influence sur la multiplication du bacille pyocyaneus. Nous ferons également la même constatation en étudiant le métabolisme azoté de cette bactérie.

Ces résultats paraissent être en opposition avec ceux trouvés par J. M. SHERMAN, G. E. HOLM et W. R. ALBUS (173, 174). Ces auteurs ont étudié la multiplication du colibacille dans une solution de peptone à 1 pour 100 à laquelle on ajoutait des quantités variables de différents sels. Dans une première série d'expériences, en évaluant la rapidité de la poussée d'après le temps nécessaire pour obtenir un trouble visible, SHERMAN et HOLM avaient trouvé que la multiplication était nettement accélérée par addition de faibles quantités de chlorure de sodium (de 5^{es},85 à 17^{es},55

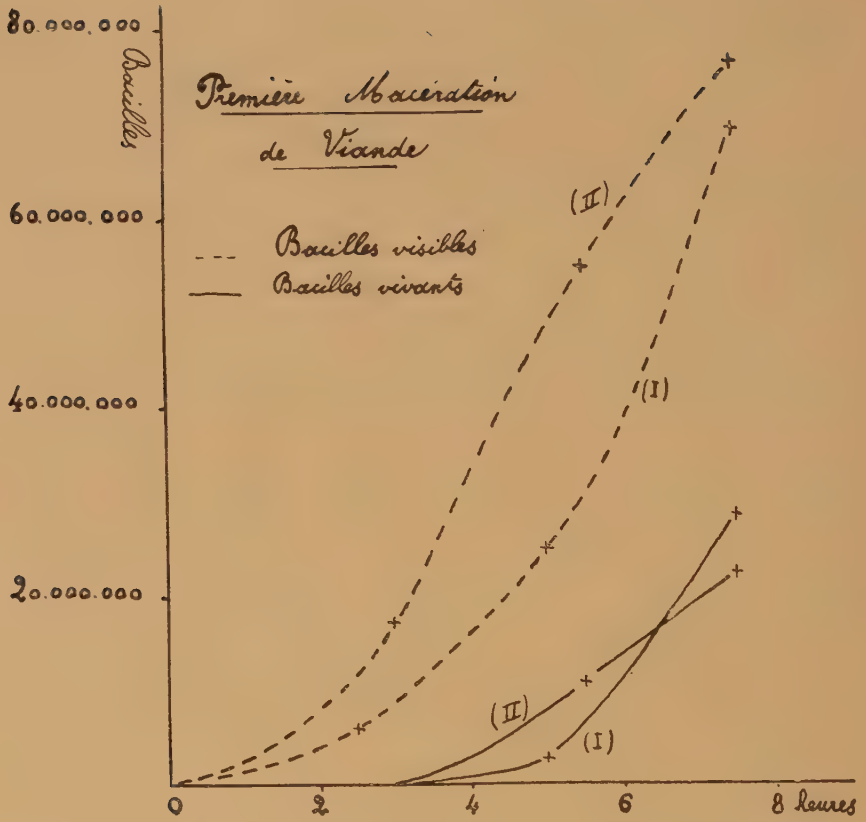
par litre). Dans de nouveaux essais, en opérant à pH 5,4 et en utilisant la méthode de numération par ensemencement sur plaque de gélose, SHERMAN, HOLM et ALBUS constatèrent également que l'addition de 11^{6^e},7 pour 1 000 de chlorure de sodium pouvait parfois diminuer la grandeur de la période de latence et qu'elle augmentait, dans tous les cas, la vitesse de multiplication pendant la période logarithmique.

Multiplication du bacille pyocyanique dans la première macération de viande.

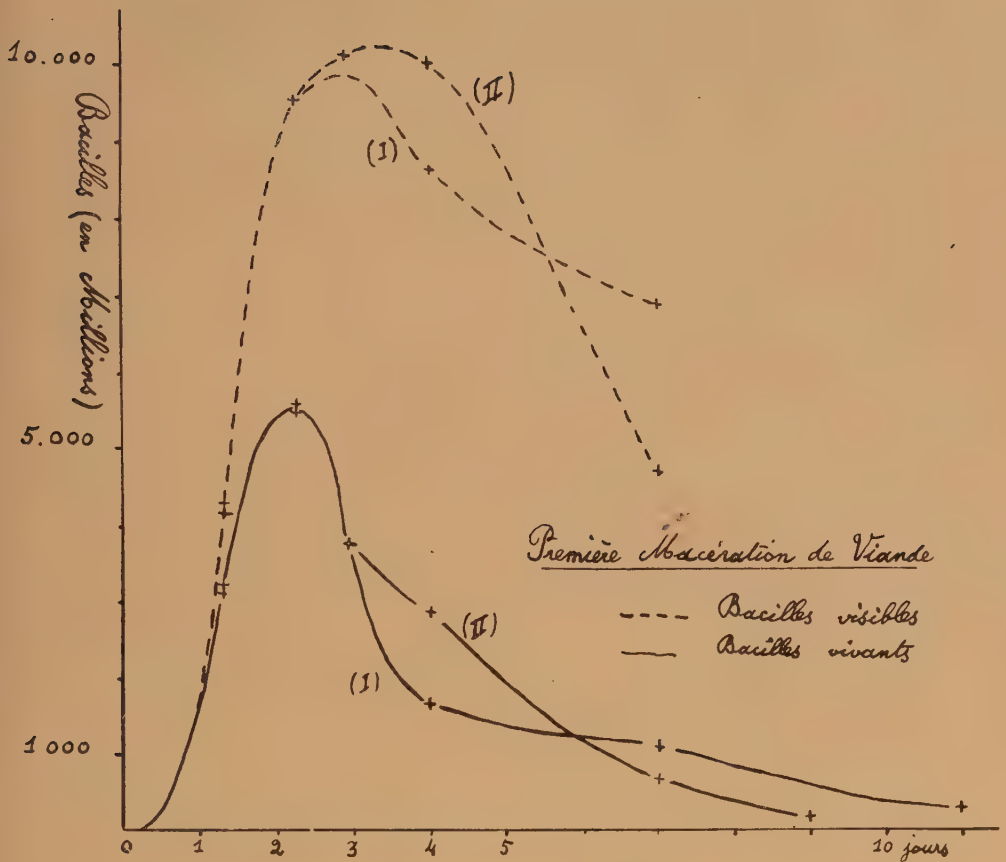
La culture se développe à peu près de la même façon que dans l'eau peptonée : louche à peine perceptible vers la 3^e heure, trouble assez net à partir de la 7^e heure et très forte opacité de la 24^e heure à la fin de la culture. Malgré les agitations successives le voile cherche à se reformer entre la 30^e heure et le 4^e jour, il présente son maximum au début de cette période puis son importance diminue peu à peu. La coloration verdâtre devient un peu plus brune à partir du 20^e jour. Nous avons groupé, dans le tableau suivant, les résultats donnés par deux ensemencements différents.

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (par centimètre cube)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (par centimètre cube)	
	premier ensemencement	deuxième ensemencement	premier ensemencement	deuxième ensemencement
0	500 000	500 000	133 000	216 000
2 heures 30	6 197 000		173 000	
3 heures		17 500 000		400 000
5 heures	24 795 000		2 700 000	
5 heures 30		54 700 000		10 866 000
7 heures 30	68 820 000	75 600 000	28 330 000	22 330 000
31 heures 30	4 262 000 000	4 173 000 000	3 200 000 000	3 100 000 000
54 heures	9 551 000 000	9 504 000 000	5 433 000 000	5 556 000 000
70 heures		10 100 000 000		3 733 000 000
4 jours	8 657 700 000	10 020 000 000	1 633 000 000	2 866 000 000
7 jours	6 903 000 000	4 690 000 000	1 086 000 000	633 000 000
9 jours		4 350 000 000		180 000 000
11 jours	8 365 000 000		233 200 000	
18 jours	6 720 000 000		13 150 000	
25 jours			7 356 000	
32 jours			5 533 000	
39 jours			4 096 000	
164 jours			ensemencement positif	

Ces nombres servent à construire les deux courbes suivantes (Courbes VII et VIII), qui permettent de suivre les variations des deux catégories de microbes en fonction du temps.



COURBE VII. — Multiplication du bacille pyocyanique dans la première macération de viande. — Premières heures de la culture.



COURBE VIII. — Multiplication du bacille pyocyanique dans la première macération de viande. — Évolution de la culture.

Dans les tableaux suivants nous indiquons, comme dans le cas de l'eau peptonée, les logarithmes des nombres microbiens, la valeur de la période comprise entre deux prélèvements successifs, le nombre de bipartitions survenues pendant cette période et le temps de génération correspondant.

TEMPS DE GÉNÉRATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS LA PREMIÈRE MACÉRATION DE VIANDE

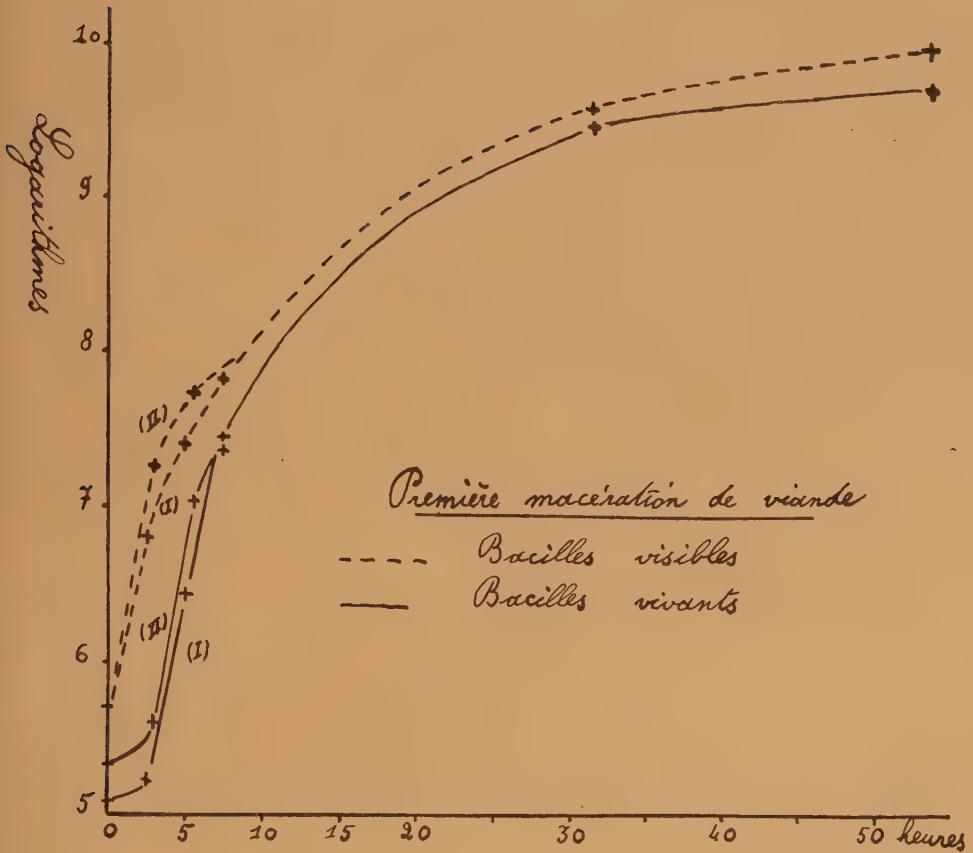
MICROBES VISIBLES.

AGE DE LA CULTURE	PREMIER ENSEMENCEMENT				DEUXIÈME ENSEMENCEMENT			
	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération
0	5,699				5,699			
2 h. 30	6,792	150'	3,63	41'		180'	5,12	35'
3 heures		150'	2	75'	7,243			
5 heures	7,394					150'	1,64	91'
5 h. 30		150'	1,47	102'				
7 h. 30	7,837				7,738	120'	0,46	261'
31 h. 30	9,629	1440'	5,95	242'	7,878	1440'	5,78	249'
54 heures	9,98	1350'	1,16	1164'	9,620	1350'	1,18	1144'
70 heures					9,977	960'	0,09	177 h.
4 jours	9,937				10,004			
7 jours	9,839				10,001			
					9,671			

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE.

AGE DE LA CULTURE	PREMIER ENSEMENCEMENT				DEUXIÈME ENSEMENCEMENT			
	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération
0	5,124				5,334			
2 h. 30	5,238	150'	0,38	394'		180'	0,89	202'
3 heures		150'	3,96	38'	5,602			
5 heures	6,431					150'	4,76	31', 5
5 h. 30		150'	3,39	44'				
7 h. 30	7,452				7,036	120'	1,04	115'
31 h. 30	9,505	1440'	6,82	211'	7,349	1440'	7,11	202'
54 heures	9,735	1350'	0,76	29 ^h 30'	9,491	1350'	0,84	26 ^h 45'
70 heures					9,745			
4 jours	9,213				9,572			
7 jours	9,036				9,457			
					8,801			

Ces résultats nous permettent de construire les courbes logarithmiques suivantes (Courbe IX), qui présentent les mêmes caractères que celles que nous avons déjà obtenues dans le cas de l'eau peptonée.



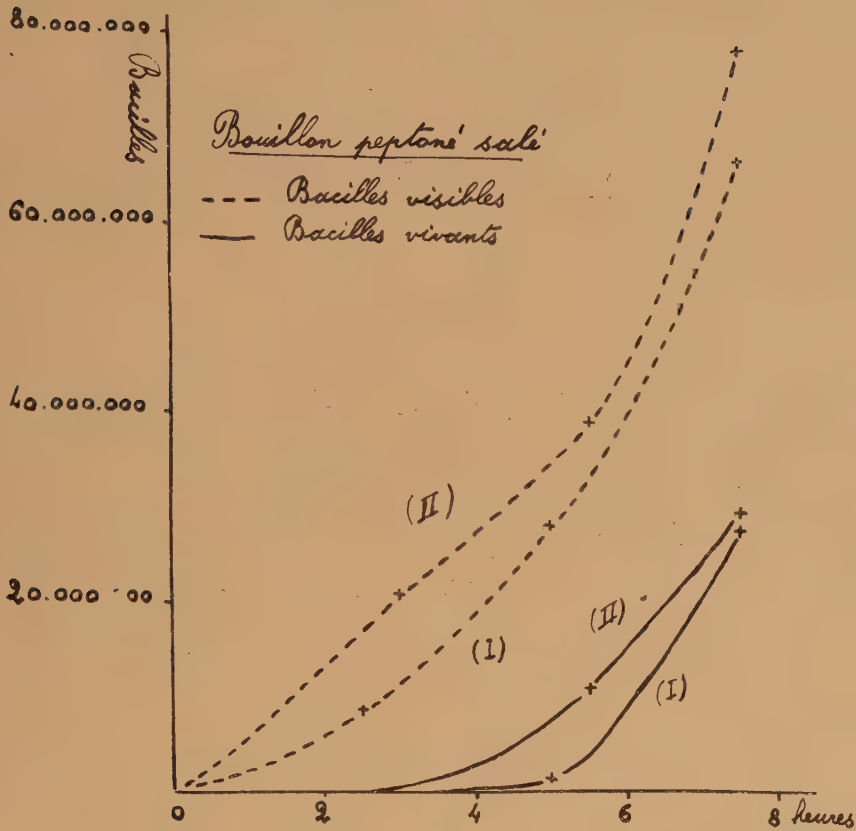
COURBE IX. — Multiplication du bacille pyocyaneus dans la première macération de viande. — Variations des logarithmes des nombres microbiens en fonction de l'âge de la culture.

Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon peptoné salé.

La culture évolue de la même façon que dans la première macération de viande. Cependant le milieu est un peu plus trouble et les voiles sont un peu plus importants, le liquide devient légèrement visqueux et la coloration est toujours un peu plus brune que pour la première macération de viande. Les résultats, fournis par deuxensemencements différents, sont réunis dans le tableau suivant :

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (par centimètre cube)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (par centimètre cube)	
	premier ensemencement	deuxième ensemencement	premier ensemencement	deuxième ensemencement
0	500 000	500 000	160 000	186 000
2 heures 30	8554 000		180 000	
3 heures		20 900 000		246 000
5 heures	28 000 000		1 166 000	
5 heures 30		39 000 000		10 633 000
7 heures 30	66 600 000	78 400 000	27 330 000	29 330 000
31 heures 30	9527 000 000	4748 000 000	5 666 000 000	3 833 000 000
54 heures	13 161 000 000	6556 000 000	6 300 000 000	5 600 000 000
70 heures		8280 000 000		4333 000 000
4 jours	19 145 000 000	7050 000 000	4 400 000 000	3 000 000 000
7 jours	12 618 000 000	7898 000 000	1 736 000 000	1 733 000 000
9 jours		5359 000 000		1 750 000 000
11 jours			8690 000	
18 jours			22 860 000	
25 jours			11 940 000	
32 jours			7 150 000	
39 jours			7 026 000	
164 jours			ensemencement positif	

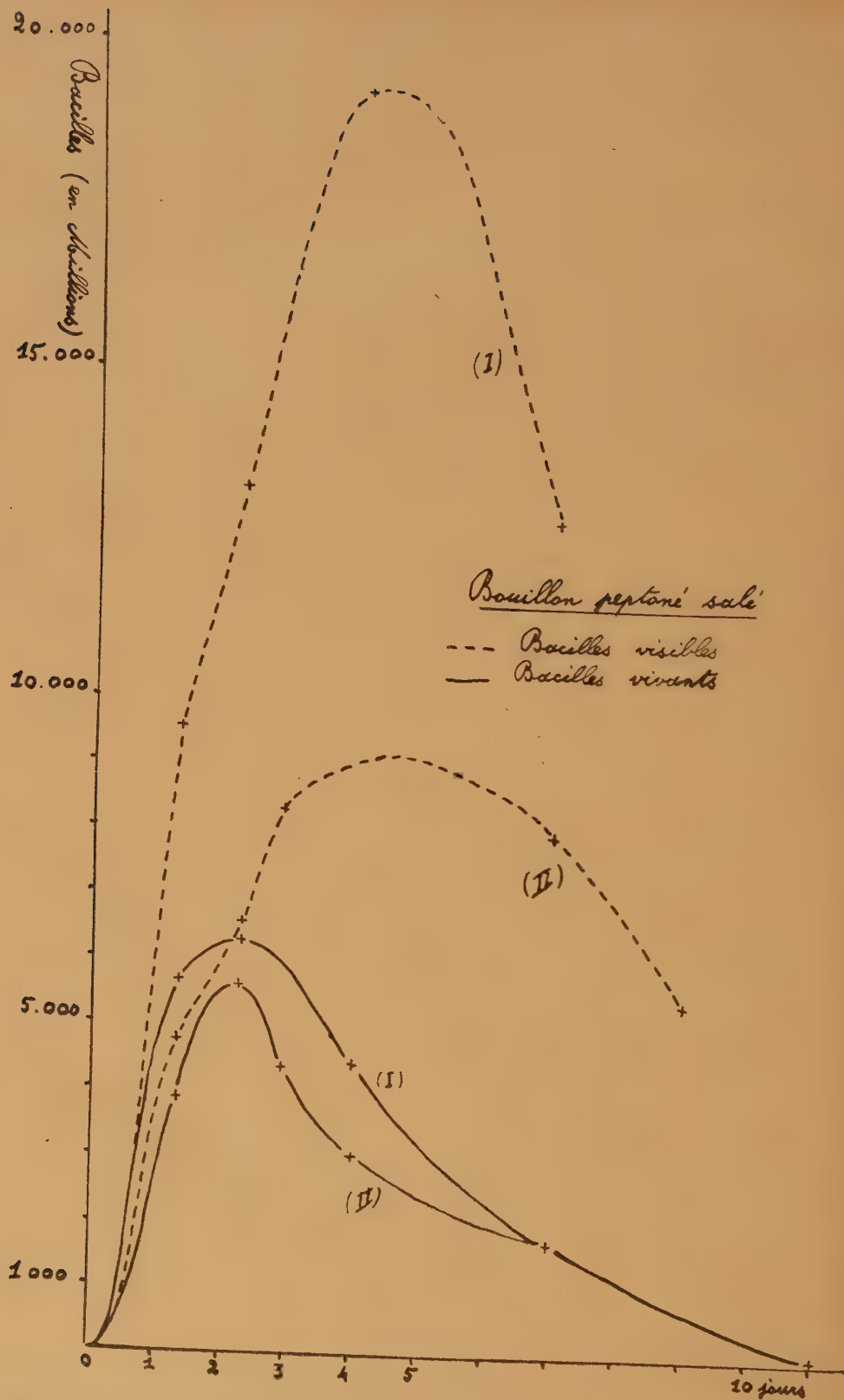
Ces chiffres nous permettent de construire les courbes suivantes (Courbes X et XI) :



COURBE X. — Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon peptoné salé. — Premières heures de la culture.

(Voir Courbe XI, p. 104.)

Nous pouvons maintenant calculer les logarithmes des nombres microbiens et donner, pour les microbes visibles et pour les microbes capables de se multiplier, la valeur du temps de génération aux différentes périodes de la multiplication.



COURBE XI. — Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon peptoné salé. — Evolution de la culture.

TEMPS DE GÉNÉRATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS LE BOUILLON PEPTONÉ SALÉ

MICROBES VISIBLES.

AGE DE LA CULTURE	PREMIER ENSEMENCEMENT				DEUXIÈME ENSEMENCEMENT			
	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.
0	5,699				5,699			
2 h. 30	6,932	150'	4,09	36',6		180'	5,38	33',4
3 heures		150'	1,71	88'				
5 heures	7,447				7,320	150'	0,9	166'
5 h. 30		150'	1,24	121'				
7 h. 30	7,823				7,591	120'	1	120'
		1440'	7,16	201'	7,894			
31 h. 30	9,979	1350'	0,46	49 heures	9,676	1440'	5,92	243'
54 heures	10,119	2520'	0,54	78 heures	9,816	1350'	0,46	49 heures
70 heures					9,918	960'	0,33	49 heures
4 jours	10,282				9,848			
7 jours	10,101				9,897			

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE.

AGE DE LA CULTURE	PREMIER ENSEMENCEMENT				DEUXIÈME ENSEMENCEMENT			
	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.
0	5,204				5,260			
2 h. 30	5,255	150'	0,17	882'		180'	0,4	450'
3 heures		150'	2,7	55'				
5 heures	6,067				5,391	150'	5,43	27',6
5 h. 30		150'	4,55	33'				
7 h. 30	7,437				7,026	120'	1,46	82'
		1440'	7,69	187'	7,467	1440'	7,03	204'
31 h. 30	9,753	1350'	0,15	150 heures	9,583	1350'	0,54	42 heures
54 heures	9,799				9,748			
70 heures					9,637			
4 jours	9,643				9,477			

En partant de ces chiffres, nous pouvons établir les courbes suivantes (Courbe XII) qui présentent la même forme générale que les courbes correspondantes des autres ensemcements.



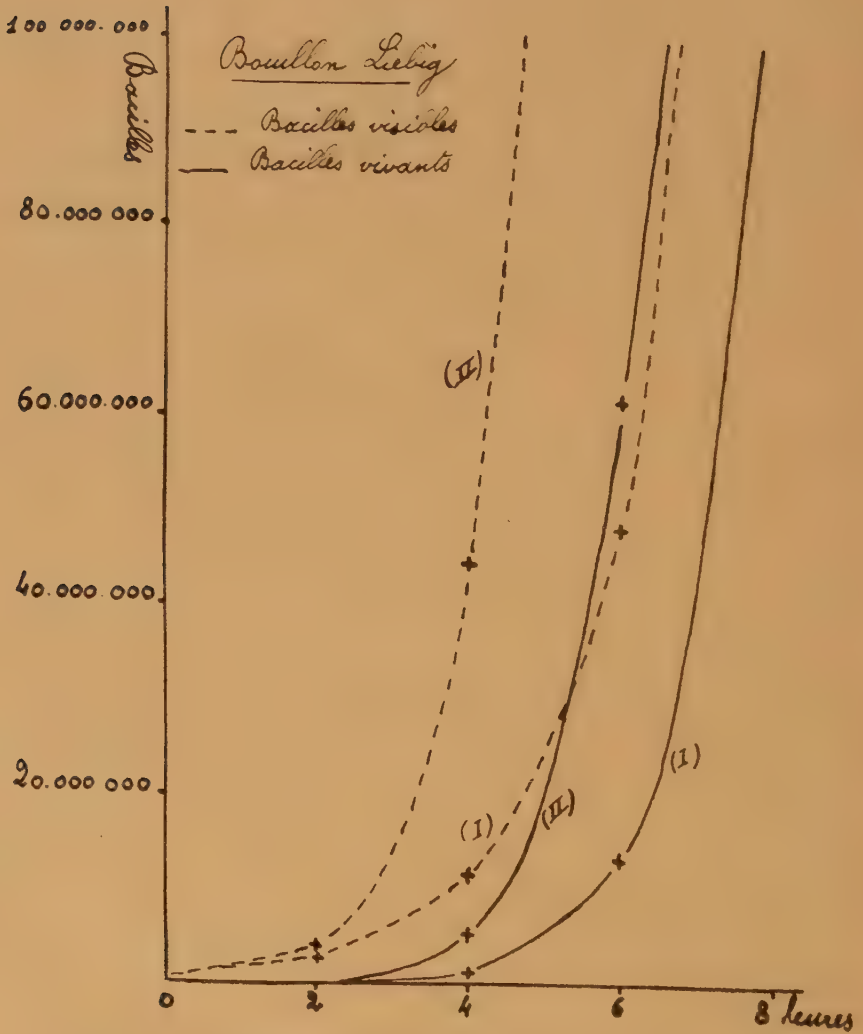
COURBE XII. — Multiplication du bacille pyocyaneus dans le bouillon peptoné salé.
— Variations des logarithmes des nombres microbiens en fonction de l'âge de la culture.

Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon à l'extrait de viande Liebig.

Le développement microbien s'effectue ici suivant le même rythme que dans les autres milieux. Cependant les colorations obtenues sont beaucoup moins belles, le liquide reste jaune brunâtre, et la viscosité de la culture est souvent très marquée. Nous retrouvons dans ce liquide, comme dans tous les autres milieux, l'odeur caractéristique du bacille pyocyanique. Les résultats fournis par deuxensemencements sont groupés dans le tableau suivant :

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³)	
	Premier ensemencement.	Deuxième ensemencement.	Premier ensemencement.	Deuxième ensemencement.
0	500 000	500 000	210 000	210 000
2 heures	2 600 000	3 900 000	180 000	380 000
4 heures	11 400 000	44 000 000	1 060 000	5 280 000
6 heures	47 400 000	224 000 000	13 000 000	61 000 000
8 heures	457 000 000	1 240 000 000	110 000 000	180 000 000
24 heures	13 519 000 000	7 766 000 000	4 460 000 000	3 500 000 000
30 heures	20 031 000 000	7 755 000 000	5 500 000 000	4 660 000 000
48 heures		10 582 000 000		2 200 000 000
76 heures	20 400 000 000		2 258 000 000	
4 jours	9 372 000 000	8 085 000 000	726 000 000	1 716 000 000
6 jours				70 000 000
7 jours	6 446 000 000		44 000 000	
8 jours	5 890 000 000		6 670 000	14 520 000
10 jours				24 000

Ces chiffres permettent de construire les courbes suivantes (Courbes XIII et XIV) :



COURBE XIII. — Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon à l'extrait de viande LIEBIG. — Premières heures de la culture.



Si nous passons maintenant au calcul des logarithmes nous obtenons les tableaux suivants :

TEMPS DE GÉNÉRATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS LE BOUILLON A L'EXTRAIT DE VIANDE LIEBIG

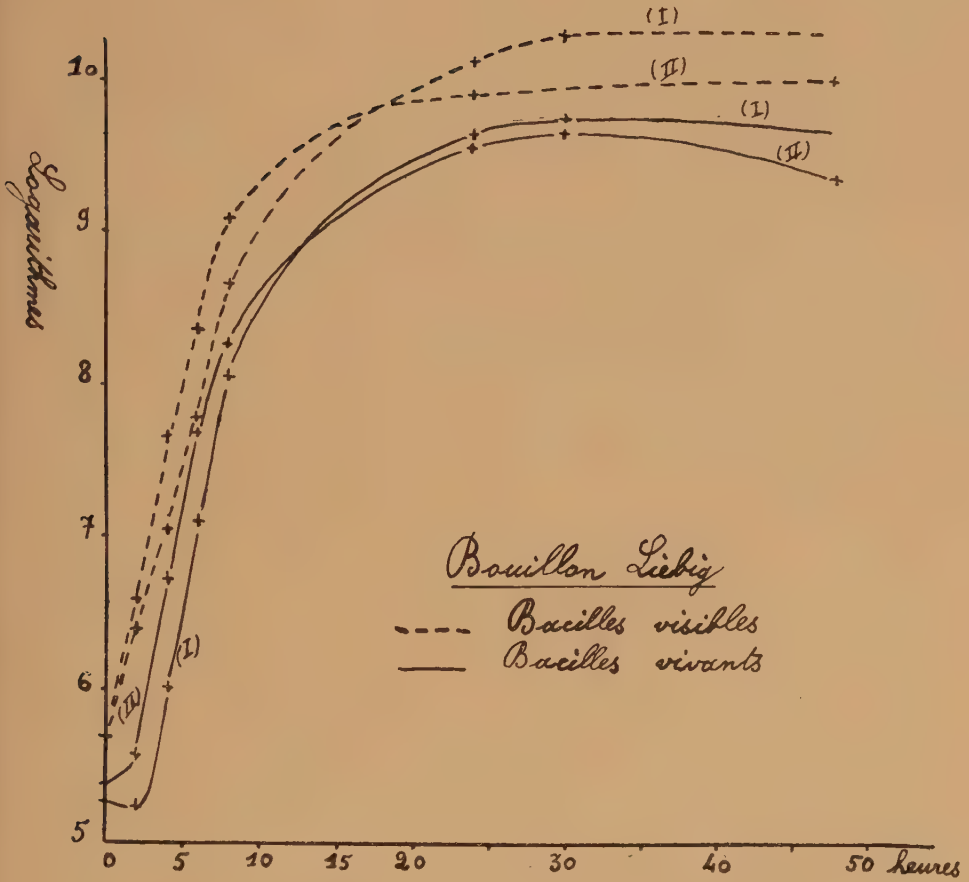
MICROBES VISIBLES.

AGE DE LA CULTURE	PREMIER ENSEMENCEMENT				DEUXIÈME ENSEMENCEMENT			
	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.
0	5,699				5,699			
2 heures	6,415	120'	2,38	50'	6,591	120'	2,96	40'.5
4 heures	7,057	120'	2,13	56'	7,643	120'	3,49	34',4
6 heures	7,676	120'	2,05	58'	8,350	120'	2,35	51'
8 heures	8,66	120'	3,26	37'	9,093	120'	2,46	49'
24 heures	10,131	960'	4,88	196'	9,89	960'	2,64	363'
30 heures	10,301	360'	0,56	643'	10,025	1440'	0,44	54 h. 30'
48 heures		2760'	0,03	1533 heures				
76 heures	10,31							

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE.

AGE DE LA CULTURE	PREMIER ENSEMENCEMENT				DEUXIÈME ENSEMENCEMENT			
	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération	LOGARITHMES des nombres microbiens.	INTERVALLE entre deux prélèvements.	NOMBRE de bipartitions pendant cette période.	TEMPS de génération.
0	5,322				5,322			
2 heures	5,255	120'	0	∞	5,58	120'	0,85	141'
4 heures	6,025	120'	2,55	47'	6,723	120'	3,8	31',5
6 heures	7,114	120'	3,61	33'	7,785	120'	3,52	34'
8 heures	8,041	120'	3,08	39'	8,255	120'	1,56	77'
24 heures	9,649	960'	5,34	179'	9,544	960'	4,28	224'
30 heures	9,740	360'	0,3	20 heures	9,668	360'	0,41	878'
48 heures					9,342			

Ces résultats servent à construire les courbes suivantes (Courbe XV).



COURBE XV. — Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon à l'extrait de viande LIEBIG. — Variations des logarithmes des nombres microbiens en fonction de l'âge de la culture.

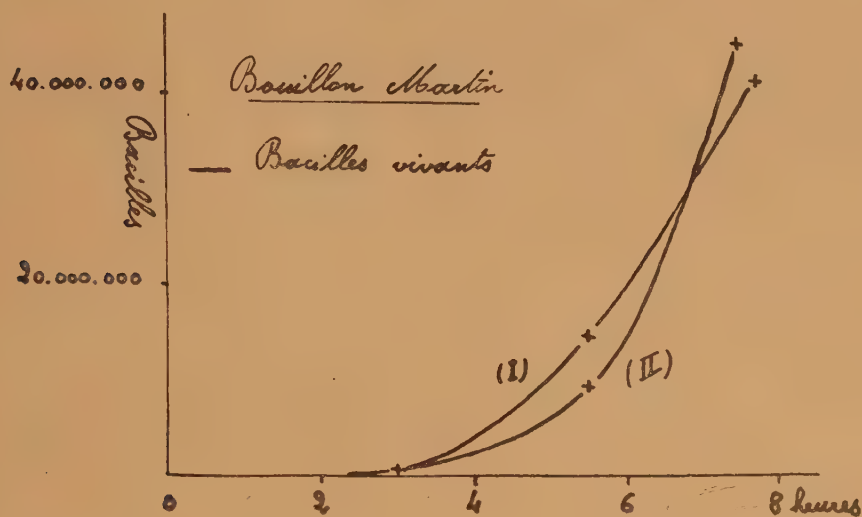
Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon Martin.

Le bacille pyocyanique se développe normalement dans ce milieu. La culture, très légèrement opalescente à partir de la 3^e heure, présente, dès la 7^e heure, un trouble nettement visible. Le milieu, très opaque à partir de la 30^e heure conservera cet aspect jusqu'à la fin de l'expérience, on constate en outre que le liquide devient légèrement visqueux après le 10^e jour. Le voile peut apparaître dès la 7^e heure, malgré les agitations répétées, il se reforme assez facilement entre la 30^e heure et le 4^e jour, puis il disparaît complètement. La coloration jaune verdâtre prend naissance vers la 30^e heure, elle augmente d'intensité, passe au vert entre le 3^e et le 6^e jour, puis elle s'atténue et vire au vert rougeâtre ou au vert brunâtre.

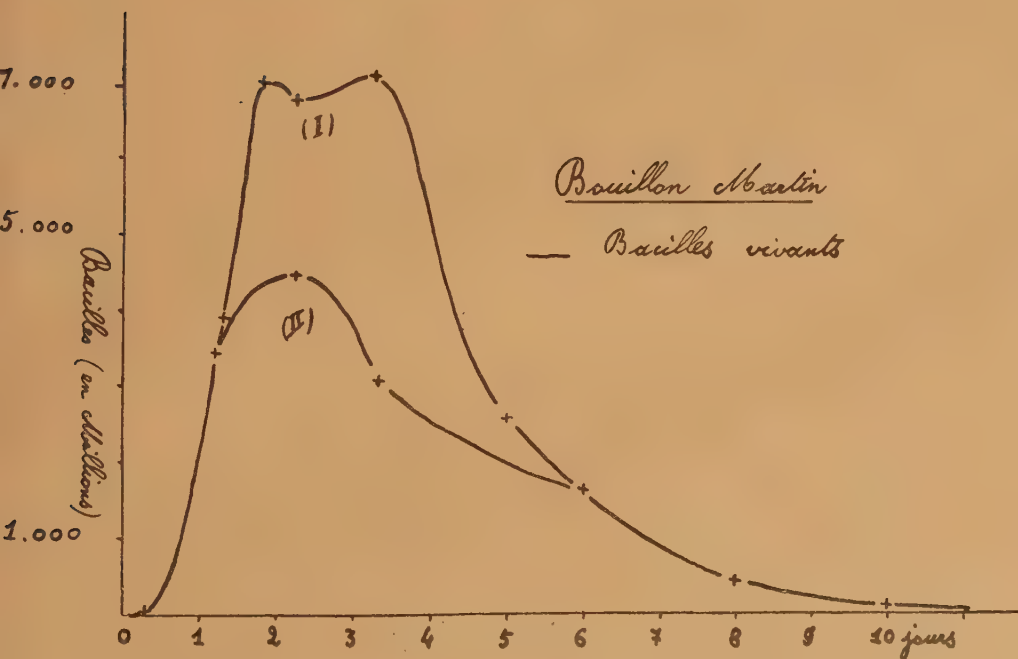
Dans ce milieu nous avons seulement dénombré les bacilles capables de se reproduire sur plaque de gélose. Nos résultats sont réunis dans le tableau suivant :

AGE de la CULTURE	NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²)		AGE de la CULTURE	NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²)	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement		1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0	373 000	576 000	79 heures	7 033 000 000	3 030 000 000
3 heures	580 000	1 020 000	5 jours	2 543 000 000	
5 h. 30	149 000 000	9 330 000	6 jours		1 600 000 000
7 h. 30		453 000 000	8 jours	410 000 000	
7 h. 45	41 660 000		10 jours		90 000 000
28 h. 30		3 433 000 000	12 jours	51 330 000	
31 heures	3 900 000 000		17 jours		11 130 000
46 heures	7 000 000 000		19 jours	8 233 000	
54 h. 30	6 733 000 000	4 460 000 000	135 jours		ensemencement positif.

Ces nombres nous permettent d'établir les courbes suivantes (Courbes XVI et XVII) :



COURBE XVI. — Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon MARTIN. — Premières heures de la culture.



COURBE XVII. — Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon MARTIN. — Evolution de la culture.

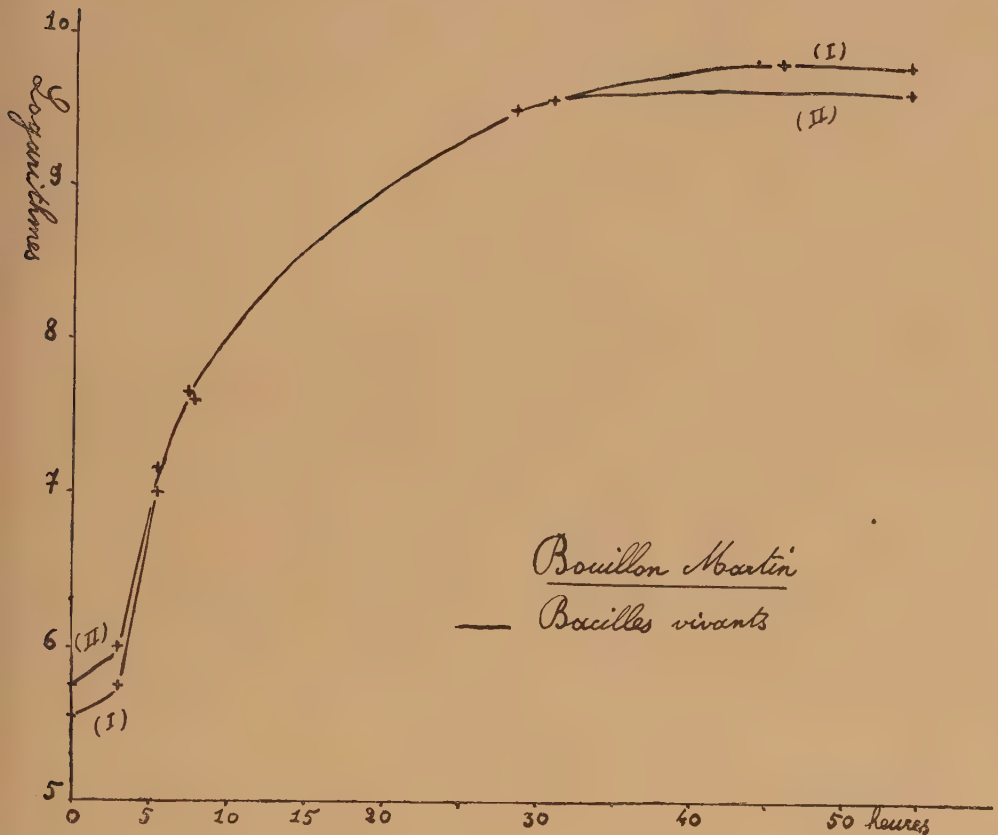
Les logarithmes des nombres microbiens et les temps de génération sont indiqués dans le tableau suivant :

TEMPS DE GÉNÉRATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS LE BOUILLON MARTIN

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE.

AGE DE LA CULTURE	PREMIER ENSEMENCEMENT				DEUXIÈME ENSEMENCEMENT			
	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération
0	5,572				5,76			
3 heures	5,763	180'	0,63	286'	6,009	180'	0,82	219'
5 h. 30	7,173	150'	4,68	32'	6,97	150'	3,19	47'
7 h. 30		135'	1,48	91'	7,656	120'	2,28	52'
7 h. 45	7,62					1260'	6,24	202'
28 h. 30		1395'	6,54	213'	9,536			
31 heures	9,591					1560'	0,37	70 h.
46 heures	9,845	900'	0,84	1071'				
54 h. 30	9,828				9,649			

Ces logarithmes permettent de construire la courbe suivante (Courbe XVIII) :



COURBE XVIII. — Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon MARTIN.
Variations des logarithmes des nombres microbiens en fonction de l'âge de la culture.

Multiplication du bacille pyocyanique dans la seconde macération de viande.

Dans ce milieu, relativement pauvre en substances nutritives, la multiplication du bacille pyocyanique paraît s'effectuer comme dans les autres liquides. Cependant on n'observe jamais la formation d'un voile et la culture présente une belle coloration verte, beaucoup plus nette que dans les autres milieux. Enfin le liquideensemencé reste toujours très fluide.

Nous avons simplement dénombré les bacilles capables de se multiplier sur gélose. Deux ensemencements, effectués à 30 jours de distance dans deux fractions identiques, nous ont donné les résultats suivants :

MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS LA SECONDE MACÉRATION DE VIANDE

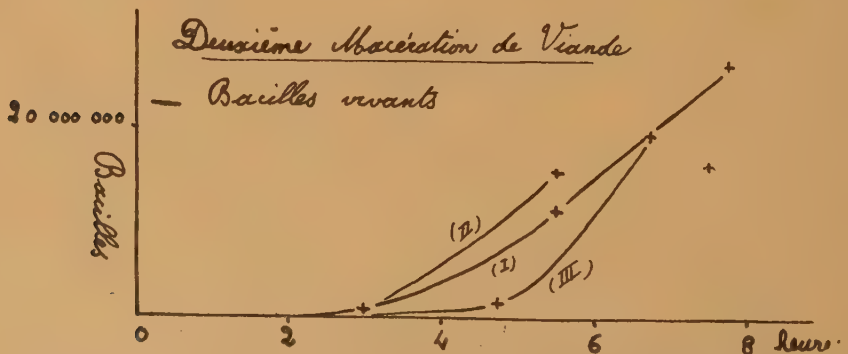
AGE de la CULTURE	NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³)		AGE de la CULTURE	NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³)	
	1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement		1 ^{er} ensemencement	2 ^e ensemencement
0	493 000	513 000	79 heures	1913 000 000	2 100 000 000
3 heures	1 016 000	1 433 000	5 jours	393 000 000	
5 h. 30	11 350 000	15 500 000	6 jours		543 000 000
7 h. 30		16 000 000	8 jours	350 000 000	
7 h. 45	26 660 000		10 jours		183 000 000
28 h. 30		203 000 000	12 jours	80 000 000	
31 heures	2 776 000 000		17 jours		159 000 000
46 heures	2 366 000 000	1 560 000 000	19 jours	8 766 000	
54 h. 30	2 023 000 000	2 700 000 000	35 jours	ensemencement positif	ensemencement positif

Le même bacille cultivé 9 mois plus tard dans une autre macération préparée ultérieurement mais en opérant de la même façon, nous a donné les chiffres suivants, qui sont très voisins des précédents :

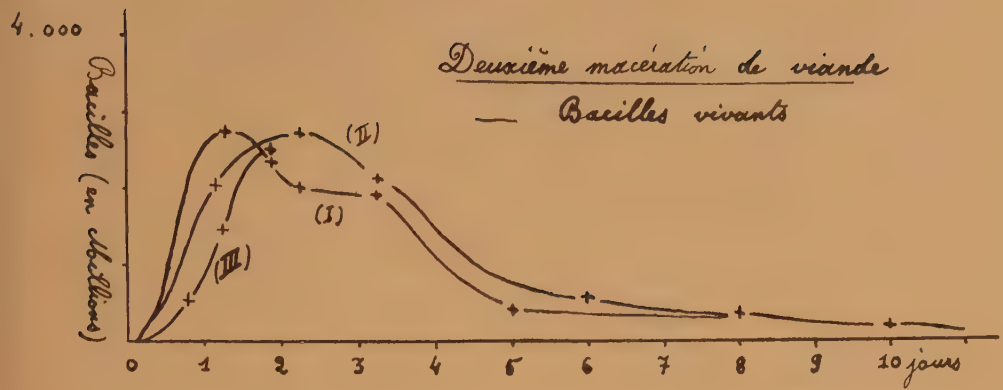
AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (par centimètre cube)	AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (par centimètre cube)
0	243 000	21 heures 15	530 000 000
2 heures 45	383 000	30 heures	1 463 000 000
4 heures 45	1 530 000	45 heures 15	2 506 000 000
6 heures 45	19 260 000		

Ces chiffres permettent de construire les courbes suivantes (Courbes XIX et XX).

Sur ces graphiques les chiffres I, II et III désignent respectivement les 1^{er}, 2^e et 3^e ensemencements.



COURBE XIX. — Multiplication du bacille pyocyanique dans la seconde macération de viande. — Premières heures de la culture.



COURBE XX. — Multiplication du bacille pyocyaneus dans la seconde macération de viande. — Evolution de la culture.

Dans les tableaux suivants nous indiquons les logarithmes des nombres microbiens ainsi trouvés et les temps de génération aux différentes périodes de la culture.

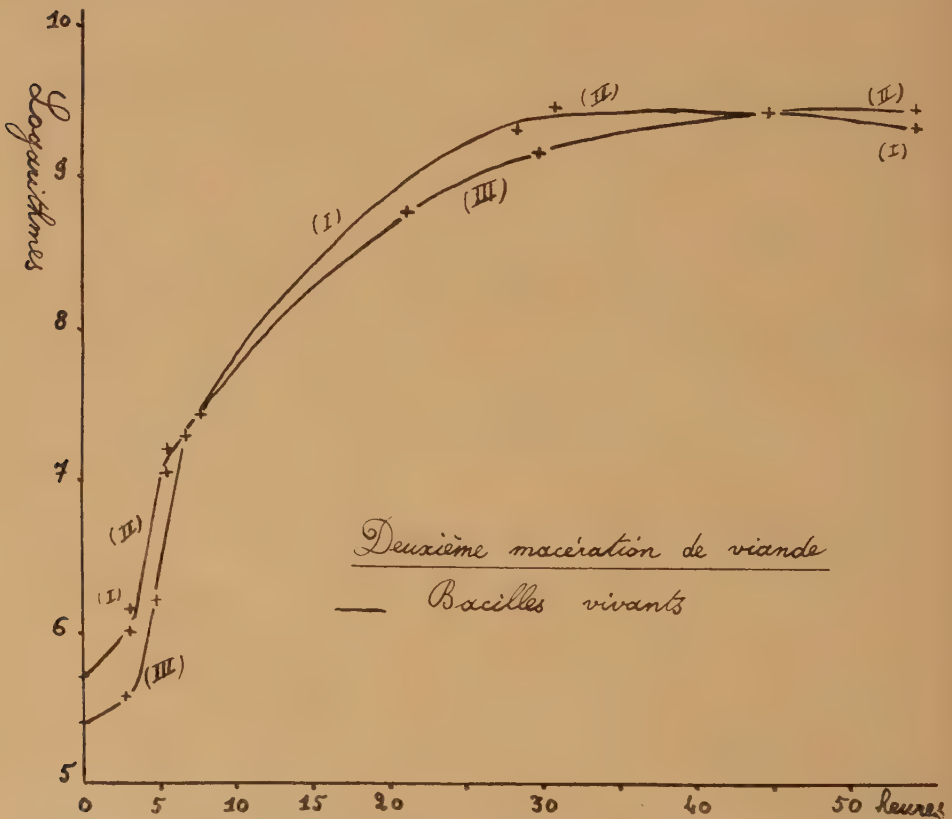
TEMPS DE GÉNÉRATION DU BACILLE PYOCYANEUS DANS LA SECONDE MACÉRATION DE VIANDE

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE.

AGE DE LA CULTURE	PREMIER ENSEMENCEMENT				DEUXIÈME ENSEMENCEMENT			
	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélevements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélevements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération
0	5,693				5,710			
3 heures	6,007	180'	1,04	173'	6,156	180'	1,48	121'
5 h. 30	7,055	150'	3,48	43'	7,190	150'	3,43	43',7
7 h. 30		135'	1,22	110'	7,204	120'	0,04	3000'
7 h. 45	7,426					1260'	6,98	180'
28 h. 30		1395'	6,7	208'	9,307			
31 heures	9,443				1560'	0,41		63 h.
54 h. 30	9,305				9,431			

AGE DE LA CULTURE	TROISIÈME ENSEMENCEMENT			
	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération
0	5,386			
2 heures 45	5,583	165'	0,65	254'
4 heures 45	6,185	120'	2	60'
6 heures 45	7,285	120'	3,65	33'
21 heures 15	8,724	870'	4,78	182'
30 heures	9,165	525'	1,46	359'
45 heures 15	9,398	915'	0,77	20 heures

Nous pouvons maintenant tracer la courbe des logarithmes en fonction des temps (Courbe XXI).



COURBE XXI. — Multiplication du bacille pyocyanique dans la seconde macération de viande. — Variations des logarithmes des nombres microbiens en fonction de l'âge de la culture.

Multiplication du bacille pyocyanique dans les milieux chimiquement définis.

Pour pouvoir comparer utilement la multiplication du bacille pyocyanique dans le milieu de A. LIOT et dans celui de E. AUBEL (ces deux milieux étant ramenés à pH 7,0), nous avons groupé nos expériences et nous avonsensemencé, à la fois, ces deux milieux avec la même émulsion microbienne. La croissance bactérienne semble moins rapide dans ces liquides que dans les bouillons ordinaires.

Pendant les huit premières heures de la culture, le milieu de E. AUBEL ne présente pas de changement macroscopique appréciable. A partir de la 13^e heure le liquide devient légèrement trouble et commence à se colorer en vert, on observe, en même temps, la formation d'un léger voile. Celui-ci se reforme entre la 13^e et la 40^e heure puis disparaît. La culture, fortement trouble à partir de la 30^e heure, présente d'abord une belle coloration verte. Celle-ci s'atténue après le 3^e jour et passe peu à peu au jaune verdâtre puis au jaune rougeâtre. Pendant toute l'évolution microbienne le liquide reste très fluide mais renferme, à partir du 4^e jour, un précipité assez important.

La multiplication du bacille pyocyanique dans le milieu de A. LIOT présente sensiblement les mêmes caractères. Cependant dans notre deuxième expérience le liquide, qui au moment de l'ensemencement renfermait déjà un précipité assez important, n'a présenté aucun changement macroscopique appréciable jusqu'à la 38^e heure. A ce moment la multiplication microbienne s'est déclenchée brusquement et a évolué dans les conditions ordinaires. Les résultats, fournis par deux ensemencements successifs, sont réunis dans les tableaux suivants :

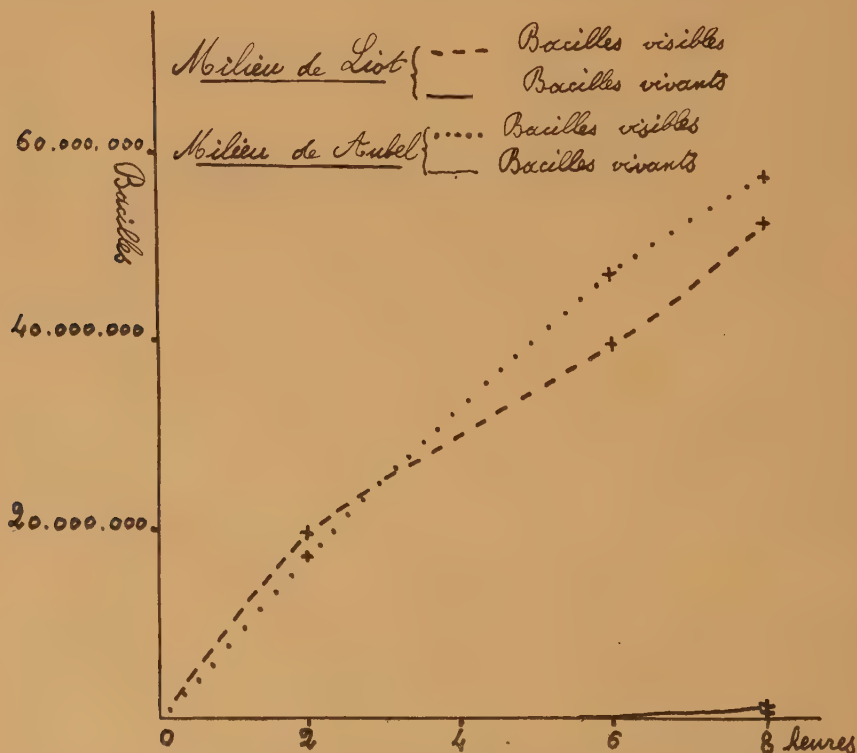
PREMIER ENSEMENCEMENT.

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAMES (par centimètre cube)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (par centimètre cube)	
	milieu de LIOT	milieu de AUBEL	milieu de LIOT	milieu de AUBEL
0	500 000	500 000	320 000	363 000
2 heures	19 500 000	16 900 000	423 000	323 000
6 heures	39 600 000	46 700 000	500 000	730 000
8 heures	52 000 000	56 800 000	1 030 000	1 730 000
30 heures	1 747 000 000	1 253 000 000	1 056 000 000	763 000 000
47 heures	1 450 000 000	1 330 000 000	1 073 000 000	203 000 000
78 heures	864 000 000	1 700 000 000	782 300 000	48 860 000
4 jours	1 830 000 000	2 389 000 000	693 600 000	38 760 000
6 jours	1 966 000 000	3 418 000 000	390 000 000	11 300 000
11 jours	1 149 000 000	1 520 000 000	113 600 000	830 000
15 jours	1 518 000 000	1 830 000 000	70 460 000	
36 jours			ensemencement positif	ensemencement positif

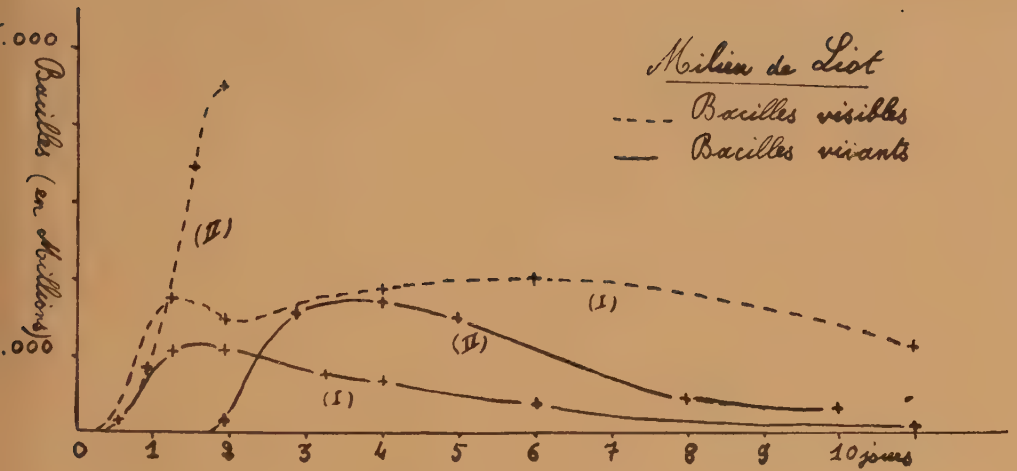
DEUXIÈME ENSEMENCEMENT.

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (par centimètre cube)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (par centimètre cube)	
	milieu de LIOT	milieu de AUBEL	milieu de LIOT	milieu de AUBEL
0	500 000	500 000	270 000	316 000
13 heures 40	128 000 000	137 000 000	330 000	833 000 000
22 heures 15	816 000 000	1 832 000 000	330 000	273 000 000
38 heures	3 480 000 000	1 288 000 000	1 199 600	533 000 000
46 heures 30	4 520 000 000	2 112 000 000	1 486 000 000	260 000 000
69 heures			1 540 000 000	172 300 000
4 jours			1 713 000 000	
5 jours			1 496 000 000	503 000 000
8 jours			466 000 000	1 600 000
10 jours			331 600 000	828 000
17 jours			60 160 000	626 000

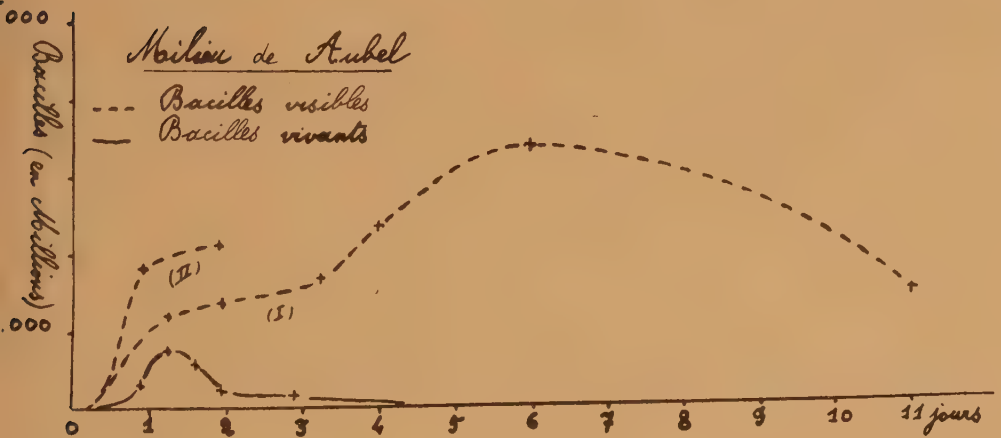
Nous pouvons, à l'aide de ces chiffres, construire les courbes suivantes (Courbes XXII, XXIII et XXIV) qui correspondent à des ensemencements effectués avec des souches cultivées sur bouillon Liebig gélosé.



COURBE XXII. — Multiplication du bacille pyocyanique dans les milieux chimiquement définis. — Premières heures de la culture.



COURBE XXIII. — Multiplication du bacille pyocyanique dans le milieu de LIOT. — Evolution de la culture.



COURBE XXIV. — Multiplication du bacille pyocyanique dans le milieu de AUBEL. — Evolution de la culture.

Si nous calculons maintenant les logarithmes des nombres ainsi obtenus et les temps de génération aux différentes périodes de la culture, nous obtenons les résultats suivants :

TEMPS DE GÉNÉRATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS LES MILIEUX CHIMIQUEMENT DÉFINIS

PREMIER ENSEMENCEMENT. — MICROBES VISIBLES.

AGE DE LA CULTURE	MILIEU DE LIOT				MILIEU DE AUBEL			
	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération
0	5,699				5,609			
2 heures	7,290	120'	5,28	23'	7,228	120'	5,08	23',6
6 heures	7,598	240'	1,02	235'	7,669	240'	1,46	164'
8 heures	7,716	120'	0,39	307'	7,754	120'	0,28	428'
30 heures	9,242	1320'	5,07	260'	9,098	1320'	4,46	296'
47 heures	9,161				9,124	1020'	0,08	212 h.
78 heures	8,936				9,230	1860'	0,35	88 h.
6 jours					9,534	66 h.	1,01	65 h.

DEUXIÈME ENSEMENCEMENT. — MICROBES VISIBLES.

AGE DE LA CULTURE	MILIEU DE LIOT				MILIEU DE AUBEL			
	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération
0	5,699				5,699			
13 h. 40	8,107	820'	8	102'	8,137	820'	8,1	101'
22 h. 15	8,912	515'	2,67	193'	9,263	515'	3,74	137'
38 heures	9,541	945'	2,09	452'		1455'	0,2	121 h.
46 h. 30	9,655	510'	0,38	1340'	9,324			

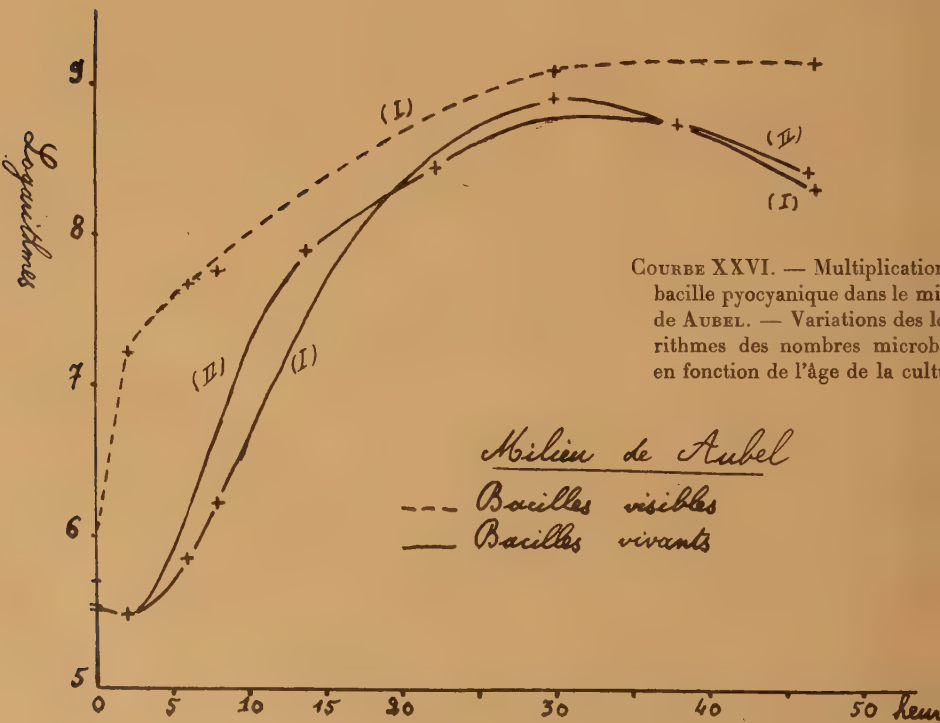
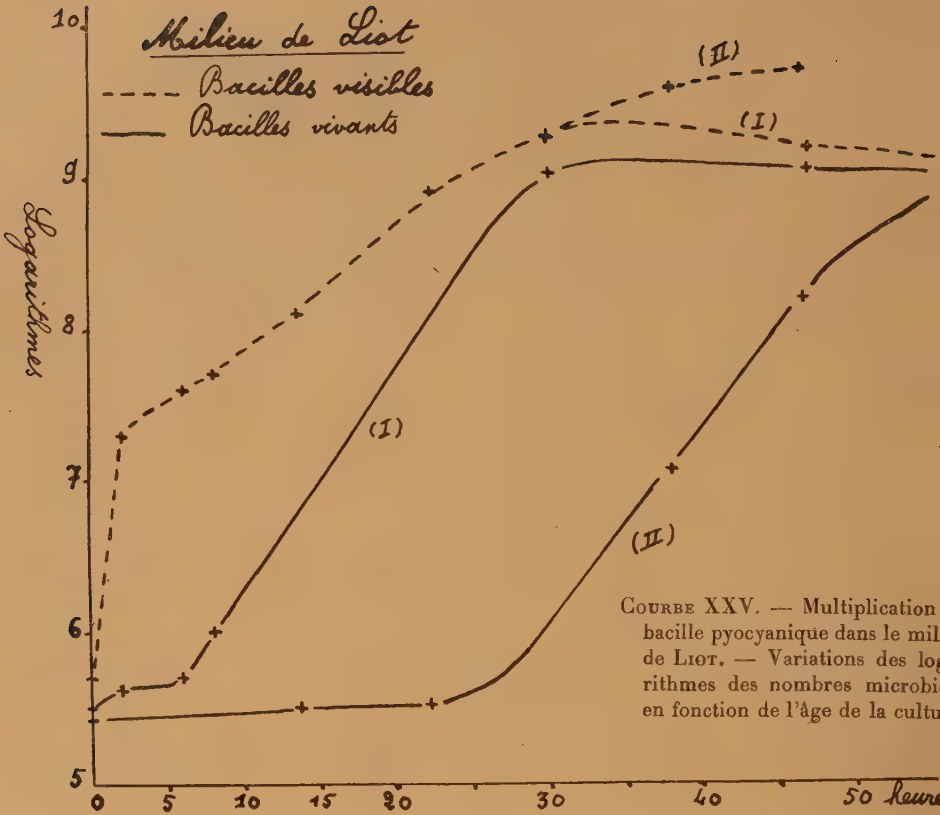
PREMIER ENSEMENCEMENT. — MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE.

AGE DE LA CULTURE	MILIEU DE LIOT				MILIEU DE AUBEL			
	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération
0	5,505				5,560			
2 heures	5,626	120'	0,4	300'	5,509	120'	0	∞
6 heures	5,699	240'	0,24	1000'		240'	1,17	205'
8 heures	6,013	120'	1,04	115'	5,863	120'	1,24	96'
30 heures	9,024	1320'	10	132'	6,238	1320'	8,78	150'
47 heures	9,031	1020'	0,02	850 h.	8,882			
					8,307			

DEUXIÈME ENSEMENCEMENT. — MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE.

AGE DE LA CULTURE	MILIEU DE LIOT				MILIEU DE AUBEL			
	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération	LOGARITHMES des nombres microbiens	INTERVALLE entre deux prélèvements	NOMBRE de bipartitions pendant cette période	TEMPS de génération
0	5,431				5,5			
13 h. 40	5,518	820'	0,28	2928'	7,920	820'	8,04	102'
22 h. 15	5,518	515'	0	∞	8,436	515'	1,71	301'
38 heures	7,079	945'	5,18	182'	8,727	945'	0,96	984'
46 h. 30	8,172	510'	3,63	140'	8,415			
69 heures	9,187	1350'	3,37	400'	8,236			
4 jours	9,234	1620'	0,15	180 h.				

Ces logarithmes permettent de tracer, pour chaque milieu, les courbes suivantes (Courbes XXV et XXVI) :



COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS

Ces résultats nous renseigneront d'abord, indirectement, sur la valeur des méthodes de numération utilisées. En comparant ensuite, au point de vue général, les chiffres donnés pour la totalité des microbes visibles aux chiffres obtenus pour l'ensemble des microbes capables de se reproduire sur gélose, nous en déduirons des indications sur l'évolution de la multiplication microbienne. Passant ensuite à l'étude particulière des différents milieux de culture, nous chercherons à nous rendre compte si le développement microbien s'effectue de la même façon dans chacun de ceux-ci ou si, l'un d'entre eux, est supérieur aux autres. Enfin, après avoir passé assez rapidement sur l'évolution de la morphologie bactérienne au cours des différentes phases de la multiplication, nous formulerons une hypothèse générale permettant de coordonner nos résultats, et nous chercherons à en déduire des indications pratiques.

1° Les méthodes proposées donnent-elles de bons résultats dans l'étude numérique de la multiplication microbienne ?

D'une façon générale nous pouvons constater, par l'examen des tableaux ou des courbes, que les méthodes de numération employées donnent des chiffres parfaitement réguliers. Dans nos deux ensemencements conjugués en eau peptonée simple et en eau peptonée salée, nous avons toujours obtenu, pour ces deux liquides et pour les différents prélèvements, des chiffres pratiquement identiques, qu'il s'agisse des microbes visibles ou des microbes « capables de se reproduire ».

Les deux méthodes utilisées donnent, dans les premiers jours de l'essai, des résultats satisfaisants. La numération des germes visibles, déjà assez pénible dans une culture récente, devient de plus en plus difficile au fur et à mesure du vieillissement. En effet les bacilles peuvent présenter des formes variables et ressembler à de très courts coccobacilles ou même à de petits cocci, en outre des débris de toutes sortes (bactéries partiellement autolysées et plus ou moins mal colorées, précipités divers) viennent se fixer sur les préparations et rendent la numération à peu près impossible. A ce moment d'ailleurs la partie la plus intéressante de la multiplication microbienne est depuis longtemps terminée.

Deux ensemencements successifs, effectués dans deux milieux identiques, donnent-ils toujours des résultats comparables ? Si nous examinons les chiffres maximums obtenus pour les bacilles capables de se multiplier sur gélose, nous constatons que, sauf dans le cas du bouillon MARTIN, ces nombres sont assez voisins les uns des autres. Parfois même, dans la représentation graphique de la croissance microbienne, les points obtenus pour une expérience se placent exactement sur la courbe correspondant à l'essai

précédent. C'est le cas, en particulier, pour la première macération de viande. Les résultats sont au contraire beaucoup moins bons lorsqu'on considère le nombre maximum des microbes visibles. Nous observons ici des différences de l'ordre de 50 pour 100 sans pouvoir en expliquer l'origine. Pour le bouillon Liebig, par exemple, nos deux cultures renfermaient à l'origine, par centimètre cube, 210 000 bacilles « capables de se reproduire » pour 500 000 bacilles « visibles ». Au bout de 30 heures le nombre des premiers était passé à 5 500 000 000 pour une expérience et à 4 660 000 000 pour l'autre. A ces nombres correspondaient 20 031 000 000 de bacilles « visibles » dans le premier cas et 10 582 000 000 dans l'autre. Cependant nos deux expériences renfermaient, au départ, la même quantité de ces deux catégories de microbes. Si le chiffre maximum des bacilles « capables de se reproduire » est sensiblement constant lorsqu'on s'adresse à des milieux identiques, on peut au contraire observer parfois des différences importantes lorsqu'on utilise des milieux préparés de la même façon mais dans des « lots » différents.

C'est ce que nous constaterons, dans le chapitre suivant, lorsque nous étudierons les modifications chimiques apportées par la multiplication bactérienne à la composition des milieux de culture. Les numérations faites à ce propos ne sont pas aussi précises que celles que nous venons d'examiner, elles servaient simplement à contrôler l'évolution normale de la multiplication bactérienne et la grande quantité de liquide mise en œuvre ne permettait pas de réaliser des agitations parfaites. Elles permettent cependant de constater que tandis que l'eau peptonée salée donne toujours des résultats à peu près comparables (3 466 000 000 en janvier 1929, 3 563 000 000 en février 1930, 3 130 000 000 en mai 1930), les milieux plus complexes fournissent des nombres beaucoup plus discordants. Ces différences peuvent être expliquées par des variations dans la composition des macérations de viande ou des extraits utilisés, ou même par des différences dans les durées et les degrés de chauffage. Des bouillons de préparation identique, obtenus à des « fournées » différentes, ne donnent donc pas toujours les mêmes résultats et cette observation est à la base des grands efforts faits par les bactériologistes pour créer des milieux synthétiques à rendements constants. Remarquons pourtant que, même dans ce cas, la constante n'existe que à 1/20 près (chiffres établis pour le milieu de RAULIN).

2° Comparaison des résultats donnés par les deux méthodes de numération.

Les chiffres fournis par la méthode desensemencements sur plaques de gélose sont toujours plus petits que ceux qui sont donnés par la méthode de numération microscopique. Ces résultats, semblables à ceux qu'ont trouvés HEHEWERTH (98) et WILSON (190), ne sauraient nous étonner. En effet, alors que la numération des colonies ne compte que les microbes

les plus vigoureux, microbes qui sont capables de se reproduire dans un milieu différent de leur milieu originel, la numération des microbes visibles évaluée, non seulement ces germes vigoureux, mais encore des bacilles plus fragiles, incapables de se reproduire sur milieu solidifié par la gélose, mais cependant susceptibles de se multiplier dans les bouillons liquides où ils sont nés et où les conditions sont bien plus favorables. En outre les microbes incapables de toute reproduction, microbes « morts » selon notre définition, restent en suspension dans le liquide, et sont comptés comme « microbes visibles » jusqu'à ce que leur lyse se produise.

Il n'existe pas de proportion constante entre le nombre des microbes capables de se reproduire sur gélose et la totalité des germes visibles. Ce rapport présente des variations considérables même lorsqu'on s'adresse à des bactéries prélevées dans les mêmes conditions. Pour nos différentes expériences il possède, au temps 0, les valeurs suivantes : une première émulsion nous donne :

$$\frac{116\,600}{500\,000} = 0,23 \quad \text{et} \quad \frac{120\,000}{500\,000} = 0,24,$$

ce qui montre l'exactitude des méthodes employées. Mais, si nous considérons de nouvelles suspensions microbiennes, nous trouvons $\frac{133}{500} = 0,26$;

$$\frac{160}{500} = 0,32 ; \quad \frac{186}{500} = 0,37 ; \quad \frac{210}{500} = 0,42 ; \quad \frac{216}{500} = 0,43 ; \quad \frac{320}{500} = 0,64 ;$$

$$\frac{346}{500} = 0,69 ; \quad \frac{363}{500} = 0,72 \quad \text{et} \quad \frac{400}{500} = 0,8. \text{ On ne peut donc pas dire de façon}$$

certaine que, dans telles et telles conditions, il y aura tant de microbes « vigoureux » pour tant de microbes « visibles ». Nous touchons là à un des points les moins connus de la physiologie microbienne. Suivant des causes qui nous échappent encore en très grande partie, les bactéries modifient leur vitalité. Ces phénomènes sont de la plus haute importance en pratique, non seulement au point de vue de la conservation des souches, mais encore au point de vue de la préparation des toxines, des vaccins et des sérums ou pour l'essai des antiseptiques. Il est à remarquer que nous trouverions les mêmes irrégularités dans la valeur du rapport précédent, si nous opérions sur des chiffres beaucoup plus élevés, qui devraient pourtant correspondre à une valeur plus exacte de la moyenne de la masse microbienne.

Les courbes obtenues (bacilles visibles et bacilles capables de se multiplier sur gélose) ont le même aspect général. Après une phase de croissance, intense mais brève, elles atteignent toutes les deux leur maximum, puis la décroissance se produit, moins rapidement du reste que la croissance. Cependant, quand on examine ces courbes plus attentivement, on remarque qu'il existe entre elles des différences importantes.

La multiplication des microbes visibles commence dès le moment de l'ensemencement. Les temps de génération, très petits pendant les deux

ou trois premières heures, augmentent ensuite peu à peu jusqu'à devenir infiniment grands.

Au contraire le nombre des bacilles capables de se multiplier sur gélose ne varie pas, ou très peu, pendant les premières heures de la culture. Cette phase de latence, pendant laquelle les temps de génération sont très grands, se prolonge pendant 2 ou 3 heures, puis la multiplication rapide se déclare et nous entrons dans la phase logarithmique. Pendant cette période, dont la durée est ordinairement de 2 heures et demie à 6 heures, les temps de génération sont très faibles, ils augmentent ensuite peu à peu jusqu'à devenir infiniment grands, comme dans le cas des microbes visibles.

Nous voyons donc que, lorsqu'on suit l'évolution de la multiplication microbienne au moyen de la méthode de numération microscopique de tous les germes visibles, la phase de latence n'existe pas. Celle-ci n'est mise en évidence que lorsqu'on utilise la méthode de numération des colonies développées sur milieu solide, méthode employée exclusivement par les nombreux auteurs qui ont étudié ce phénomène. Par suite nos résultats confirment les remarques faites par J. RÉGNIER et S. LAMBIN (160) en 1927, et rendent inutiles les différentes hypothèses émises pour expliquer l'existence de la phase de latence. La multiplication bactérienne commence aussitôt après l'ensemencement ; les microbes, plongés dans un milieu liquide de composition favorable, se divisent dès les premières heures de la culture, mais cette multiplication, très précoce et très rapide, ne donne d'abord naissance qu'à des sujets peu vigoureux, susceptibles de se reproduire dans le bouillon où ils sont nés, mais incapables de résister à un changement de milieu et de se reproduire sur plaques de gélose. Nous exposerons tout à l'heure comment nous pouvons concevoir la poussée microbienne en tenant compte de ces différentes observations.

Les maximums des deux courbes considérées ne se produisent généralement pas au même moment. Tandis que le maximum des bacilles capables de se reproduire est obtenu le plus souvent entre la 30^e et la 54^e heure de la culture, celui des microbes visibles retarde généralement de 16 à 48 heures sur le précédent. En même temps la phase de maximum stationnaire est plus marquée pour les microbes visibles que pour les microbes capables de se reproduire.

A l'exception des milieux synthétiques, les temps de génération minima sont toujours plus grands pour les bacilles visibles que pour les bacilles capables de se reproduire. Ceci est d'ailleurs naturel puisque la multiplication des premiers est freinée par les microbes incapables de toute reproduction et qui, dans le cas qui nous occupe, peuvent être considérés comme morts. Il en résulte que la proportion entre ces deux catégories de microbes varie au cours de la poussée. C'est ainsi que pendant les deux ou trois premières heures, correspondant à l'ancienne phase de latence, le rapport entre les microbes « vigoureux » et les microbes visibles diminue nettement. Le nombre des premiers reste en effet sensiblement stationnaire tandis que les seconds se reproduisent déjà très rapidement. Un peu plus tard

les microbes « vigoureux » se multiplient à leur tour et, comme leur temps de génération est inférieur à celui des microbes visibles, le rapport augmente et les deux nombres tendent à se rejoindre. Enfin le maximum des microbes capables de se multiplier se produit avant celui des bacilles visibles et, à partir de ce moment, le rapport commence à décroître. Cette diminution s'accroît de plus en plus à mesure que la culture vieillit car les microbes « vigoureux » sont de moins en moins nombreux tandis que les bactéries, même mortes, restent encore longtemps visibles. C'est ainsi que ce rapport, dans le cas de la 1^{re} macération de viande (1^{er} ensemencement), présente successivement les valeurs suivantes :

TEMPS		TEMPS	
0.	$\frac{133}{500} = 0,26$	54 heures.	$\frac{5433}{9551} = 0,56$
2 heures 1/2.	$\frac{173}{6197} = 0,02$	4 jours	$\frac{1633}{8657} = 0,18$
5 heures.	$\frac{2700}{24795} = 0,10$	7 jours	$\frac{1086}{6903} = 0,15$
7 heures 1/2.	$\frac{28330}{68820} = 0,41$	11 jours.	$\frac{233}{8365} = 0,03$
31 heures 1/2.	$\frac{3200}{4262} = 0,75$	18 jours.	$\frac{13}{6720} = 0,002$

3° Étude de la multiplication microbienne dans les différents milieux de culture.

Nous avons condensé, dans les tableaux suivants, les éléments caractéristiques de la multiplication microbienne dans les différents milieux utilisés.

En nous basant sur la valeur des temps de génération nous avons distingué, dans l'évolution de la culture, trois parties principales : phase de latence, phase de multiplication rapide ou phase logarithmique et phase de multiplication ralentie. Nous indiquons, pour chaque ensemencement, les limites et la durée de chacune de ces périodes et les temps de génération correspondants. Il est ainsi facile de se rendre compte que ces temps varient fortement lorsqu'on passe d'une phase à une autre. Le premier tableau, réservé aux microbes visibles, ne comporte pas de phase de latence, le second, consacré aux microbes capables de se reproduire sur gélose, comprend les trois périodes principales. Dans le troisième tableau nous avons comparé, toujours pour chaque ensemencement, le maximum des microbes « vivants » au maximum des microbes « visibles ». Nous indiquons, en même temps, les heures de la culture qui correspondent à ces maxima et les intervalles qui les séparent. D'une façon générale le nombre des germes « visibles » n'atteint sa limite supérieure qu'après celui des bacilles « vivants ». Enfin, pour terminer, nous donnons le nombre des germes encore « vivants » après 9 jours de séjour à l'étuve à 37°. Ces

derniers chiffres ont été déterminés directement par ensemencement, ou calculés par interpolation entre deux résultats voisins. Nous avons examiné séparément les milieux naturels et les milieux synthétiques.

MICROBES VISIBLES.

		EAU PEPTONÉE simple	EAU PEPTONÉE salée	PREMIÈRE MACÉRATION de viande	BOUILLON PEPTONÉ SALÉ	BOUILLON A L'EXTRAIT Liebig
<i>Phase logarithmique.</i>						
Limites de la période.	{ 1	0-3 h.	0-3 h.	0-2 h. 1/2	0-2 h. 1/2	0-8 heures
	{ 2	0-2 h. 1/2	0-2 h 1/2	0-3 heures	0-3 h.	0-8 heures
Temps de génération.	{ 1	43'	44'	41'	36',6	37'-58'
	{ 2	36'	33',5	35'	33',4	35'-51'
<i>Phase de multiplication ralentie.</i>						
Limites de la période.	{ 1	3 h.-46 h.	3h-29h	2h 1/2-54h	2h 1/2-96h	8 h.-76 h.
	{ 2	3 h.-52 h.	3h-52h	3 h.-70 h.	3 h.-70 h.	8 h.-48 h.
Durée de la période.	{ 1	43 heures	26 h.	51 h. 1/2	93 h. 1/2	68 heures
	{ 2	49 heures	49 h.	67 heures	67 heures	40 heures
Temps de génération.	{ 1	80'-200'	71'-174'	75'-1164'	88'-78 h.	196'-1533 h.
	{ 2	76'-33h 1/2	66'-543h	91'-177 h.	120'-49 h.	363'-54h 1/2

NOMBRES MAXIMUMS POUR LES DIFFÉRENTS MILIEUX.

		EAU PEPTONÉE simple	EAU PEPTONÉE salée	PREMIÈRE MACÉRATION de viande	BOUILLON PEPTONÉ salé	BOUILLON à l'extrait Liebig	BOUILLON MARTIN	DEUXIÈME MACÉRATION de viande
Maximum des microbes «vivants»	{ 1	3300	3466	5433	6300	5500	7000	2776
(en millions).	{ 2	2766	4033	5556	5600	4660	4460	2700
Maximum des microbes «visibles»	{ 1	10150	9900	9551	19145	20400		
(en millions).	{ 2	5680	5127	10100	8280	10582		
Heure du premier maximum.	{ 1	46h 1/4	46h 1/4	54h	54h	30h	46h	31h
	{ 2	30h 1/4	30h 1/4	54h	54h	30h	54h 1/2	54h 1/2
Heure du deuxième maximum	{ 1	46h 1/4	46h 1/4	54h	96h	76h		
	{ 2	52h	77h	70h	70h	48h		
Différence entre les deux.	{ 1	0	0	0	+42h	+46h		
	{ 2	+21h 3/4	+46h 3/4	+16h	+16h	+18h		
Nombre de germes «vivants» après 9 jours de culture (en millions).	{ 1			600	911	6	321	285
	{ 2	160	86	180	1750	7	467	273

Tous les milieux examinés donnent sensiblement les mêmes résultats. La phase de latence se prolonge pendant 2 ou 3 heures, comme l'in-

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE.

	EAU PEPTONÉE SIMPLE	EAU PEPTONÉE SALÉE	PREMIÈRE MACÉRATION DE VIANDE	BOUILLON PÉTONÉ SALÉ	BOUILLON A L'EXTRAIT LIÉBIG	BOUILLON MARTIN	DEUXIÈME MACÉRATION DE VIANDE
<i>Phase de latence.</i>	0-3 heures	0-3 heures	0-2 heures 1/2	0-2 h. 1/2	0-2 heures	0-3 heures	0-3 heures
	0-2 heures 1/2	0-2 heures 1/2	0-3 heures	0-3 heures	0-2 heures	0-3 heures	0-3 heures
	947' 200'	1 000' 91'	394' 202'	882' 450'	∞ 141'	286' 219'	0-2 heures 3/4 173' 121' 254'
<i>Temps de génération.</i>	»	»	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»	»	»
<i>Phase logarithmique.</i>	3 h.-7 h. 3/4	3 h.-7 h. 3/4	2 h. 1/2-7 h. 1/2	2 h. 1/2-7 h. 1/2	2 h.-8 h.	3 h.-5 h. 1/2	3 h.-5 h. 1/2
	2 h. 1/2-5 h.	2 h. 1/2-5 h.	3 h.-5 h. 1/2	3 h.-5 h. 1/2	2 h.-6 h.	3 h.-7 h. 1/2	3 h.-5 h. 1/2
	»	»	»	»	»	»	»
<i>Limites de la période.</i>	4 heures 3/4	4 heures 3/4	5 heures	5 heures	6 heures	2 h. 1/2	2 h. 3/4-6 h. 3/4
	2 heures 1/2	2 heures 1/2	2 heures 1/2	2 heures 1/2	4 heures	4 h. 1/2	2 heures 1/2
	»	»	»	»	»	»	4 heures
<i>Durée de la période.</i>	40'-33'	37'-36'	38'-44'	55'-33'	47'-33'	32'	43'
	31',5	34'	31',5	27',6	31',5-34'	47'-52'	44'
	»	»	»	»	»	»	33'-60'
<i>Temps de génération.</i>	»	»	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»	»	»
<i>Phase de multiplication ralentie.</i>	7 h. 3/4-46 h. 1/4	7 h. 3/4-46 h. 1/4	7 h. 1/2-54 h.	7 h. 1/2-54 h.	8 h.-30 h.	5 h. 1/2-46 h.	5 h. 1/2-31 h.
	5 heures-52 heures	5 h.-30 h. 1/4	5 h. 1/2-54 h.	5 h. 1/2-54 h.	6 h.-30 h.	7 h. 1/2-54 h. 1/2	5 h. 1/2-54 h. 1/2
	»	»	»	»	»	»	6 h. 3/4-45 h. 1/4
<i>Limites de la période.</i>	38 heures 1/2	38 heures 1/2	46 heures 1/2	46 heures 1/2	22 heures	40 h. 1/2	25 heures 1/2
	47 heures	25 heures 1/4	48 heures 1/2	48 heures 1/2	24 heures	47 heures	49 heures
	»	»	»	»	»	»	38 heures 1/2
<i>Durée de la période.</i>	198'-56 heures	202'-32 heures 1/2	211'-29 h. 1/2	187'-150 heures	179'-20 h.	91'-1071'	110'-208'
	204'-1 083 heures	106'-218'	115'-26 h. 3/4	82'-42 heures	77'-878'	202'-70 h.	180'-63 heures
	»	»	»	»	»	»	182'-20 heures

diquent les différents auteurs. Sa durée semble, ici, indépendante de la constitution des liquides de culture. De plus, les souches ont toujours été cultivées sur gélose LIEBIG et cependant la phase de latence est aussi marquée pour le bouillon LIEBIG que pour les autres milieux. La phase logarithmique des bacilles « vivants » a une durée de 2 heures et demie à 6 heures. Celle-ci semble légèrement inférieure à celle qui est indiquée par les différents auteurs. La constitution des milieux est également sans influence nette sur la valeur des temps de génération. Ces résultats, qui paraissent en contradiction avec ceux de HEHEWERTH, sont au contraire conformes à ceux de BARBER. Rappelons que cet auteur avait également montré que la suppression du sel, dans un milieu de culture, ne donnait aucune diminution appréciable du temps de génération.

Nous pouvons noter tout au plus que la phase de multiplication rapide des bacilles visibles est un peu prolongée dans le bouillon à l'extrait LIEBIG. Inversement la phase de multiplication ralentie des bacilles capables de se reproduire est plus brève dans ce milieu, de sorte que le maximum des germes « vivants » s'y trouve plus rapidement atteint que dans les autres. Mais, si l'on excepte ces quelques remarques, on peut dire que, pour ces milieux naturels, la nature de l'aliment offert ne semble pas avoir une grande influence sur la vitesse de multiplication du bacille, seul le maximum des germes capables de se reproduire sur gélose paraît être en relation avec la composition du milieu nutritif. L'augmentation du nombre des germes produits est d'ailleurs loin d'être proportionnelle à la richesse du liquide nutritif. L'eau peptonée salée donne, en moyenne, un maximum de 3 800 000 000 de bacilles par centimètre cube, la première macération de viande fournit, de son côté, un maximum moyen de 5 500 000 000 de microbes; pourtant, le bouillon peptoné salé, qui renferme réunis les éléments nutritifs de ces deux milieux, donne, non pas 9 300 000 000 de germes, mais, dans le cas le plus favorable, 6 300 000 000 de bactéries. Le bouillon à l'extrait LIEBIG qui, nous le verrons plus loin, est très riche en substances nutritives, ne donne guère plus de 5 000 000 000 de germes, comme s'il y avait là un maximum non dépassable, et se montre, au contraire, très peu favorable à la conservation des bactéries. Au bout de 9 jours de culture, il ne renferme plus en effet, par centimètre cube, que 6 à 7 millions de bacilles capables de se reproduire, chiffre très inférieur à ceux donnés par les autres milieux.

En résumé, la multiplication du bacille pyocyanique s'effectue sensiblement de la même façon dans les différents milieux naturels utilisés. Le bouillon peptoné salé donne des résultats légèrement supérieurs, cependant la première macération de viande, de préparation plus simple, se montre également très favorable, et l'eau peptonée, facile à obtenir, peu coûteuse et constante dans sa composition, pourra souvent leur être substituée.

Le développement du bacille pyocyanique dans les milieux synthétiques de LIOT et de AUBEL présente les caractères suivants :

La multiplication des bacilles visibles s'effectue rapidement pendant les deux premières heures, le temps de génération, sensiblement le même pour les deux milieux utilisés, est d'environ 23 minutes. La multiplication se ralentit ensuite peu à peu et cesse complètement entre la 30^e heure et le 6^e jour. Ces résultats sont donnés par le premier ensemencement. Ils sont confirmés par la seconde expérience, mais celle-ci ne nous fournit pas de données numériques utilisables pour la phase de multiplication rapide car le premier prélèvement, effectué à la treizième heure, a été fait beaucoup trop tardivement.

Les résultats relatifs aux bacilles capables de se multiplier sur gélose sont réunis dans les tableaux suivants :

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE.

	MILIEU DE LIOT		MILIEU DE AUBEL	
	PREMIER ensemencement	DEUXIÈME ensemencement	PREMIER ensemencement	DEUXIÈME ensemencement
<i>Phase de latence.</i>				
Limites de la période..	0-6 ^h	0-22 ^h 1/4	0-6 ^h	»
Temps de génération..	300'-1 000'	∞-2 928'	∞-205'	»
<i>Phase logarithmique.</i>				
Limites de la période..	6 ^h -30 ^h	22 ^h 1/4-46 ^h 1/2	6 ^h -8 ^h	»-13 ^h 3/4
Durée de la période..	24 ^h	24 ^h 1/4	2 ^h	
Temps de génération..	115'-132'	140'-182'	96'	102'
<i>Phase de multiplication ralentie.</i>				
Limites de la période..	30 ^h -47 ^h	46 ^h 1/2-96 ^h	8 ^h -30 ^h	13 ^h 3/4-38 ^h
Durée de la période..	17 ^h	49 ^h 1/2	22 ^h	24 ^h 1/4
Temps de génération..	850 ^h	400'-180 ^h	150'	301'-984'

NOMBRES MAXIMUMS POUR LES DIFFÉRENTS MILIEUX.

	MILIEU DE LIOT		MILIEU DE AUBEL	
	PREMIER ensemencement	DEUXIÈME ensemencement	PREMIER ensemencement	DEUXIÈME ensemencement
Maximum des microbes « vivants » (en millions).	1 073	1 713	763	533
Maximum des microbes « visibles » (en millions).	1 966		3 418	
Heure du 1 ^{er} maximum..	47 h.	96 h.	30 h.	38 h.
Heure du 2 ^e maximum..	144 h.		144 h.	
Différence entre les deux..	+ 97 h.		+ 114 h.	
Nombre de germes « vivants » après 9 jours de culture (en millions).	223	399	5	1,2

Dans les milieux synthétiques, la multiplication des bacilles visibles s'effectue donc, dès le moment de l'ensemencement, comme dans les milieux naturels. Le temps de génération, au début de la culture, semble même être, dans ce cas, légèrement inférieur au temps de génération normal.

La multiplication des bacilles capables de se reproduire sur gélose ne commence qu'après une phase de latence plus marquée que pour les bouillons ordinaires (6 heures et même, dans un cas, 22 heures). Elle s'effectue ensuite moins rapidement que dans les milieux naturels. Le temps de génération minimum varie en effet de 100 à 140 minutes tandis que, pour les milieux usuels, il reste généralement compris entre 30 et 45 minutes. La phase logarithmique semble, par contre, beaucoup plus prolongée dans le milieu de LIOT.

Enfin les maxima des bacilles capables de se multiplier sont très inférieurs à ceux trouvés pour les milieux ordinaires. Ce dernier point est particulièrement net pour le milieu de AUBEL dans lequel on ne trouve plus également, au 9^e jour de la culture, qu'un nombre relativement très faible de bacilles « vivants ».

4^e Variations dans la forme des bactéries au cours de la culture.

La méthode de numération comparative permet également d'observer des modifications dans la forme des bactéries au cours de la multiplication. Ces modifications ne sont nullement comparables aux variations signalées dans les cultures vieilles ou dans les cultures développées dans des conditions disgénésiques (présence d'antiseptiques ou pH défavorable). Vues pour la première fois par P. F. CLARK et W. H. RUEHL (40), et par HENRICI (99-103) elles ont été retrouvées par J. RÉGNIER et A. KAPLAN. Ces modifications semblent correspondre aux différentes phases de la multiplication microbienne. En procédant à la mensuration du bacille pyocyanique ensemencé dans le bouillon à l'extrait de viande LIEBIG ces derniers auteurs ont obtenu les chiffres suivants. Les bacilles, qui au moment de l'ensemencement mesuraient en moyenne 1 à 2 μ , présentent successivement, après 2 heures, 4 heures, 6 heures, 8 heures de culture, des longueurs moyennes égales à : 2 à 3 μ ; 2,5 à 3,5 μ ; 3 à 4 μ ; 3,5 à 4 μ . La taille des bactéries diminue ensuite. Elle est de 2 à 3 μ au bout de 24 heures, de 2 à 2,5 μ après 36 heures, et seulement de 2 μ à la 48^e heure. On voit donc qu'il y a, dès le début de la période logarithmique, un allongement des bacilles. Cet allongement se maintient pendant un certain temps et cesse dès que la multiplication se ralentit.

De notre côté nous avons recherché les variations de la longueur des bacilles au cours du développement dans les milieux synthétiques. Les résultats, obtenus au cours du premier ensemencement, sont donnés par le tableau suivant dans lequel nous indiquons les dimensions de la majorité des bacilles et les limites des formes extrêmes.

AGE DE LA CULTURE	MILIEU DE LIOT		MILIEU DE AUBEL	
	LONGUEUR de la majorité des bacilles	DIMENSIONS EXTRÊMES des autres bacilles	LONGUEUR de la majorité des bacilles	DIMENSIONS EXTRÊMES des autres bacilles
2 heures	1 μ ,5	de 1 μ . à 3 μ .	1 μ . à 1 μ ,5	de 1 μ . à 3 μ .
6 heures	1 μ ,5 à 2 μ ,5	de 1 μ ,5 à 6 μ .	1 μ ,5 à 2 μ ,5	de 1 μ ,5 à 3 μ .
8 heures	3 μ . à 4 et 5 μ .	de 1 μ ,5 à 7 μ .	2 μ ,5	de 1 μ ,5 à 5 μ .
30 heures	1 μ ,5 à 3 μ .	de 1 μ ,5 à 4 μ ,5	1 μ ,5 à 3 μ .	
48 heures	1 μ . à 2 μ .	1 μ . à 4 μ .	1 μ ,5	1 μ ,5 à 3 μ .
78 heures	1 μ . à 1 μ ,5	1 μ . à 3 μ .	1 μ ,5	1 μ . à 2 μ ,5
4 jours	1 μ . à 1 μ ,5	1 μ . à 3 μ .	1 μ ,5	1 μ . à 3 μ .
6 jours	1 μ ,5		1 μ ,5	1 μ . à 2 μ .

Nous voyons donc que pendant la phase logarithmique, et principalement au début de cette période, on observe un allongement net des bacilles. (Rappelons que cette phase logarithmique va de la 6^e à la 30^e heure pour le milieu de LIOT et de la 6^e à la 8^e heure pour celui de AUBEL). On constate également que, pendant cette période, les bacilles prennent le colorant d'une façon beaucoup plus intense. Les formes longues principalement, souvent accolées parallèlement par 2 ou par 3, présentent une teinte violet noir avec reflet métallique. Les bacilles jeunes fixent donc fortement les matières colorantes. Cette propriété avait également été signalée par CLARK et RUEHL.

5° Résumé et conclusion.

De l'ensemble de tous ces résultats, il nous paraît possible, à la suite de J. RÉGNIER et de A. KAPLAN, d'émettre les conclusions suivantes qui se trouvent déjà, mais en partie seulement, dans les travaux américains. Si l'on suit, comme nous l'avons fait, la multiplication microbienne dans des bouillons nutritifs on assiste aux phénomènes suivants :

Dans une première phase, correspondant aux toutes premières heures de la culture, la multiplication microbienne s'établit rapidement dans le milieu liquide et cependant les méthodes de numération des colonies sur plaque de gélose n'indiquent pas, à ce moment, d'accroissement du nombre des bactéries. Il ne se formerait donc au début de la culture que des éléments de vitalité inférieure, incapables de se reproduire dans un nouveau milieu différent de leur milieu originel.

Dans une deuxième phase, commençant vers la 2^e ou la 3^e heure, le nombre des bacilles susceptibles de se reproduire sur plaques de gélose augmente de plus en plus et tend à rejoindre le nombre des bacilles visibles. Pendant cette période de multiplication logarithmique l'examen microscopique permet de constater l'allongement des formes microbiennes.

Enfin survient une troisième phase pendant laquelle la multiplication bactérienne se ralentit. En même temps la longueur des bacilles décroît et

le rapport des formes vigoureuses à la totalité des germes diminue de plus en plus.

Il nous semble permis, dans ces conditions, d'envisager, au cours de l'évolution de la multiplication microbienne, trois périodes principales :

a) une période de jeunesse coïncidant avec l'ancienne phase de latence. Pendant celle-ci, et pour des causes diverses, peut-être identiques à celles invoquées par les auteurs pour expliquer cette phase de latence, ne prennent naissance que des organismes de vitalité limitée;

b) une période de plein développement, période de maturité ou plutôt d'adolescence, correspondant à la phase de multiplication logarithmique et pendant laquelle prennent naissance, en grand nombre, des formes de pleine vitalité, plus longues, en quelque sorte plus belles, et capables de se reproduire dans des conditions difficiles;

c) enfin, soit que les microbes sécrètent des toxines nuisibles, soit que le milieu s'épuise en substances fondamentales ou en principes moins connus mais nécessaires au développement (acides aminés, vitamines, etc.), soit enfin que les résidus du métabolisme viennent freiner la division cellulaire, nous assistons, dès la dixième heure, à l'établissement d'une période de vieillissement. Pendant cette période la multiplication se ralentit, les formes vigoureuses disparaissent et le nombre des germes capables de se reproduire sur gélose diminue rapidement.

Ces conclusions nous paraissent particulièrement intéressantes. Elles tendent, comme le faisait déjà remarquer HENRICI, à modifier nos habitudes bactériologiques. Il est, en effet, tout à fait courant d'ensemencer un jour un microbe et d'examiner la culture 24 heures après. Les constatations précédentes semblent bien montrer que, dans ce cas particulier, nos habitudes sont défavorables. Le fait d'examiner une culture 18 ou 24 heures après l'ensemencement n'a peut-être qu'une importance relative pour les applications médicales de la bactériologie, mais il n'en est pas de même pour l'étude du microbe lui-même. Au bout de ce temps la période de plein développement est en effet terminée, les microbes sont vieillis, la culture est en décadence et on n'observe plus guère que des formes diminuées dans leur vitalité et dont l'aspect est déjà modifié. Ces faits ont certainement une grande importance pour les questions bactériologiques pratiques telles que les repiquages, le maintien des propriétés biochimiques et de la virulence, ou la conservation d'une vitalité régulière indispensable pour l'étude des substances antiseptiques par exemple. Nous pensons, à la suite de J. RÉGNIER et de A. KAPLAN, qu'il y aurait, dans ces cas-là, avantage à partir d'une souche en pleine prospérité, c'est-à-dire d'une culture âgée de 4, 6 ou au plus de 8 heures.

CHAPITRE IV

TENEUR EN MATIÈRES NUTRITIVES DES MILIEUX DE CULTURE LIQUIDES AVANT ET APRÈS

LA MULTIPLICATION MICROBIENNE

(FILTRATION SUR BOUGIE A LA 48^e HEURE DE LA CULTURE)

L'étude bactériologique, faite au chapitre précédent, nous a montré que, si la multiplication du bacille pyocyanique évolue sensiblement de la même façon dans les différents milieux naturels utilisés, elle est cependant plus intense dans certains d'entre eux. Il était donc intéressant de rechercher si les différences observées pouvaient s'expliquer par des variations dans la composition chimique des liquides de culture, et si la richesse d'une culture était en rapport avec la teneur en substances nutritives des milieux employés.

En comparant la composition d'un milieu de culture avant et après le développement des bactéries, on pouvait obtenir des précisions sur les principes utiles aux germes microbiens, et en déduire des indications pour le choix d'un milieu favorable, aussi simple que possible, qu'il serait peut-être facile d'améliorer par addition de un ou de plusieurs principes convenables.

Généralités sur la nutrition des bactéries. — De nombreuses analyses chimiques faites sur les masses microbiennes desséchées, il résulte que ces organismes renferment toujours du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène, de l'azote, du phosphore, et très probablement du soufre. A ces éléments, certainement indispensables à la vie des cellules, on ajoute généralement le potassium, le chlore et le fer et, assez souvent, le sodium, le calcium et le magnésium. Les expériences destinées à démontrer la nécessité, pour la vie des bactéries, de tel ou tel élément chimique sont très difficiles à réaliser et demandent des vérifications minutieuses. Le fait qu'un élément n'est indispensable qu'à l'état de traces n'enlève rien à l'importance du rôle joué par cet élément.

Tandis que les bactéries prennent les métaux (K, Ca, Mg, Fe) et les

métalloïdes (P, S) surtout sous forme de sels minéraux simples, elles sont capables, pour l'assimilation du carbone et de l'azote, d'utiliser des aliments très divers. L'hydrogène est fourni par la plupart des composés hydrogénés mis à la disposition des germes, l'oxygène, libre dans l'air ou dissous dans l'eau, est utilisé directement par les aérobies, tandis que les anaérobies décomposent, pour leur évolution, les composés organiques qui en renferment (glucides en particulier).

La nutrition minérale du bacille pyocyanique a été particulièrement bien étudiée, grâce à l'emploi des milieux synthétiques. Les formules primitives, proposées par ARNAUD et CHARRIN (5) et par GESSARD, ont été peu à peu simplifiées, et ont donné naissance aux milieux de AUBEL et de LIOT. En reprenant le milieu déjà employé par FROUIN et M^{lle} LEDEBT, et en utilisant pour sa préparation des sels purs recristallisés quatre fois dans l'eau bidistillée, E. AUBEL (6) confirme les résultats généraux trouvés par ces auteurs et montre que les éléments nécessaires à la multiplication du bacille pyocyanique sont l'azote, le carbone, l'oxygène, l'hydrogène, le phosphore, le soufre et le potassium. Cependant, tandis que FROUIN (74) pense que le magnésium n'est pas nécessaire à la multiplication de ce bacille et qu'il ne joue un rôle que pour la formation de la pyocyanine, E. AUBEL considère que cet élément à l'état de traces est indispensable au développement bactérien. De son côté, A. LIOT (128) cultive le bacille pyocyanique en présence de phosphate de sodium, sulfate de magnésium et succinate d'ammonium. Les éléments ainsi mis en œuvre diffèrent des éléments utilisés par E. AUBEL par la substitution du sodium au potassium. Enfin J. SUPNIEWSKI (183), pour étudier la nutrition de ce même bacille, emploie comme constante minérale un mélange de chlorure de sodium, phosphate de potassium, sulfate de magnésium et chlorure de calcium.

De l'ensemble de ces recherches il semble donc que, si l'on excepte l'oxygène et l'hydrogène, les éléments les plus importants pour le développement du bacille pyocyanique sont d'abord l'azote, le carbone, le phosphore, le soufre, le magnésium, puis le potassium, le sodium, le chlore et le calcium. Dans nos expériences nous avons simplement dosé, avant et après le développement microbien, l'azote, le carbone, le phosphore, le soufre et dans une certaine mesure le chlore, existant dans les milieux de culture. Nous avons également procédé à quelques mesures physiques relatives au pH, à la tension superficielle, ou à la déviation polarimétrique. Plus tard nous envisagerons le rôle des autres éléments minéraux que nous avons laissé de côté dans ce premier travail.

MÉTHODES UTILISÉES POUR APPRÉCIER LA VALEUR NUTRITIVE DES MILIEUX DE CULTURE

Nous avons utilisé, pour faire nos dosages, des méthodes empruntées à la chimie biologique en ayant soin de prendre, de préférence, des techniques

simples dont l'exactitude a été souvent vérifiée. Ces méthodes sont les suivantes.

Mesures physiques.

1° MESURE DU pH. — La réaction des liquides de culture est continuellement modifiée sous l'influence du métabolisme bactérien. Dans nos essais, le pH a été déterminé par la méthode colorimétrique en utilisant les indicateurs et les gammes étalons de CLARK et LUBS.

2° DÉVIATION POLARIMÉTRIQUE. — Au cours de la digestion le pouvoir rotatoire des matières protéiques diminue progressivement, et les peptones pancréatiques présentent toujours un pouvoir rotatoire moins élevé que les peptones peptiques. Nous avons recherché des variations analogues en mesurant, à l'aide du polarimètre de LAURENT, la déviation polarimétrique de nos milieux stériles ou ensemencés. Malheureusement la lecture est souvent très difficile, sinon impossible, par suite de la coloration des liquides, surtout dans le cas des bouillons cultivés.

3° TENSION SUPERFICIELLE. — Les peptones, qui diminuent fortement la tension superficielle, sont dégradées par les bactéries. A cette transformation doit correspondre une modification de la tension superficielle. Pour le constater nous avons déterminé le nombre de gouttes données par 5 centimètres cubes de liquide. Nous avons utilisé pour cela une pipette de DUCLAUX donnant, à la température ordinaire, 100 gouttes d'eau pour 5 centimètres cubes.

Composés azotés.

Les besoins en azote et les moyens par lesquels ils sont satisfaits constituent une phase fondamentale du métabolisme microbien. Les composés azotés complexes doivent être réduits en leurs constituants simples avant de servir à la nutrition cellulaire. D'après L. F. RETTGER (162), la molécule protéique complexe est d'abord décomposée, à l'aide de différentes diastases, en un certain nombre d'acides-amino et peut-être aussi en d'autres constituants azotés. Les acides-amino eux-mêmes doivent être ensuite dissociés avant de pouvoir servir à la nutrition bactérienne. Cette transformation, qui s'effectue probablement à l'intérieur de la cellule même, consiste principalement en une désamination au cours de laquelle de l'ammoniaque libre se forme à partir des groupes aminés.

Les acides aminés simples, ou des amides dérivées de ces acides comme l'asparagine par exemple, constituent souvent, dans les milieux synthétiques, la seule source d'azote organique. Enfin la production et l'utilisation de l'ammoniaque sont des propriétés communes à la plupart des bactéries. Les processus se font souvent simultanément et l'ammoniaque est apparemment utilisée directement. C'est ainsi que de nombreux organismes se développent abondamment dans des milieux dans lesquels la seule source d'azote est constituée par un sel ammoniacal soluble.

Nous sommes donc amenés à doser, dans tous nos essais, l'azote total, l'azote amino-ammoniacal, l'azote aminé et l'azote ammoniacal. Dans quelques cas nous avons également évalué les bases puriques, qui peuvent parfois constituer une source d'azote et aussi la créatine et la créatinine.

1° AZOTE TOTAL. — La destruction de la matière organique a été faite suivant la technique de DENIGÈS. On opère dans un matras de KJELDAHL de 300 centimètres cubes en pyrex dans lequel on place 10 centimètres cubes du bouillon à examiner (exceptionnellement 25 centimètres cubes pour les milieux pauvres), 5 centimètres cubes d'une solution d'oxalate neutre de potassium à 30 pour 100 et 5 centimètres cubes d'acide sulfurique pur. On prolonge le chauffage pendant 3 heures et demie ou 4 heures, la décoloration étant obtenue au bout de 1 heure et demie ou 2 heures. Le procédé de destruction par l'acide sulfurique en présence d'acide phosphorique et de sulfate de potasse, préconisé par P. FLEURY et H. LEVALTIER (65), est plus rapide, mais il a l'inconvénient de laisser un enduit très adhérent dans le matras de KJELDAHL et, en outre, le contenu du matras, repris par l'eau, donne une solution qui cristallise facilement et empêche d'en prélever exactement une fraction connue.

La destruction sulfurique achevée on laisse refroidir, on ajoute un peu d'eau, et on neutralise presque complètement avec de la lessive de soude en présence de phénolphthaléine. Il faut avoir soin de refroidir le liquide au fur et à mesure de la neutralisation et revenir immédiatement à une légère acidité, par addition d'acide sulfurique normal, si le virage se produit. On transvase ensuite le contenu du matras de KJELDAHL dans un ballon jaugé de 50 centimètres cubes et on complète au trait de jauge avec les eaux de lavage du matras.

Il ne reste plus qu'à procéder au dosage de l'ammoniaque. Pour cela on prélève 25 centimètres cubes de la solution obtenue, on les introduit dans l'appareil de MEILLÈRE et de SAINT-RAT (131), on alcalinise par addition de 1 centimètre cube à 1^{cm}³, 5 de lessive de soude, et on procède à la distillation. L'ammoniaque, entraînée par la vapeur d'eau et condensée, est titrée au fur et à mesure de son dégagement par l'acide sulfurique déci-normal en présence d'alizarine-sulfonate de sodium comme indicateur (133). L'opération est terminée en 7 ou 8 minutes.

Si l'on désigne par n le nombre de centimètres cubes d'acide sulfurique N/10 utilisé, l'azote total du milieu étudié est donné, en grammes par litre, par la relation :

$$\text{Az total par litre} = 0^{\text{gr}},0014 \times 2n \times 100.$$

Le dosage de l'azote par la méthode de KJELDAHL donne toujours des résultats inférieurs à ceux obtenus en utilisant, pour cela, la méthode de DUMAS. Nous avons donc là une cause d'erreur par défaut qui a été particulièrement étudiée par W. MESTREZAT (134), (135), (138). Cet auteur a montré que différents groupements azotés : nitrates, nitrites, pyridine et

dérivés, etc., n'étaient qu'incomplètement ou même nullement dosés par la méthode de KJELDAHL. Cependant nous pensons que ces molécules résistantes sont peu nombreuses dans nos expériences et, qu'au point de vue comparatif, nos résultats conservent toute leur valeur.

2° AZOTE AMINO-AMMONIACAL. — L'azote amino-ammoniacal a été déterminé en utilisant la méthode de SÖRENSEN simplifiée par MESTREZAT (132). Cette technique comporte les opérations suivantes :

a) *Préparation du témoin.* — A 10 centimètres cubes de formol neutralisé, placés dans une fiole conique de 60 centimètres cubes, on ajoute 30 centimètres cubes d'eau distillée bouillie, de façon à réaliser un volume total voisin du volume final du dosage, X gouttes d'une solution alcoolique de phénolphtaléine à 1 pour 100, et $0^{cm^3},4$ de solution décimale de soude de façon à communiquer au liquide une teinte rouge franc.

b) *Élimination des phosphates et des carbonates.* — Ces sels ne permettent pas d'obtenir un virage net, il est donc indiqué de les éliminer. A 25 centimètres cubes de bouillon, placés dans un ballon jaugé de 50 centimètres cubes, on ajoute 11 gouttes de solution alcoolique de phénolphtaléine et 1 gramme de chlorure de baryum pulvérisé. Après dissolution de celui-ci, on ajoute au mélange un excès d'eau de baryte saturée ($2^{cm^3},5$ en plus de la quantité nécessaire pour provoquer le virage de l'indicateur), on bouche le ballon et on laisse reposer un quart d'heure. Au bout de ce temps, on complète à 50 centimètres cubes avec de l'eau distillée bouillie, on filtre rapidement et on prélève 20 centimètres cubes du filtrat, soit 10 centimètres cubes de bouillon, qui serviront à faire le dosage.

c) *Dosage de l'azote amino-ammoniacal.* — Les 20 centimètres cubes du filtrat, placés dans une fiole conique de 60 centimètres cubes, sont d'abord décolorés par addition d'acide chlorhydrique à 2 pour 100, ils sont ensuite additionnés de X gouttes de solution alcoolique de phénolphtaléine et ramenés à la teinte rose pâle au moyen de une ou deux gouttes de solution décimale de soude. On verse alors dans le mélange 10 centimètres cubes de formol neutralisé (formol identique à celui qui a été utilisé pour préparer le témoin), ce qui provoque la décoloration du liquide, et on ajoute goutte à goutte de la solution décimale de soude jusqu'à ce qu'on obtienne une teinte rouge comparable à celle du témoin. La comparaison est rendue plus facile en examinant les deux fioles au-dessus d'une feuille de papier blanc écrite. On utilise ainsi n centimètres cubes de soude.

En retranchant du nombre n les $0^{cm^3},4$ employés pour colorer le témoin, on obtient un nouveau nombre n' qui représente le volume de soude utilisé pour la neutralisation des fonctions acides libérées par le formol. Ce nombre n' , multiplié par $0^{gr},001414$, représente en azote, correction faite pour tenir compte du retard apporté au virage par les sels ammoniacaux, la somme Az aminé + Az ammoniacal existant dans 10 centimètres cubes de bouillon. L'azote amino-ammoniacal du milieu utilisé est

donc donné, en grammes par litre, par la relation :

$$\text{Az amino-ammoniacal} = 0^{gr},001414 \times n' \times 100.$$

Avec des milieux très colorés, il est parfois assez difficile de voir nettement les virages soit pour la neutralisation par l'eau de baryte, soit même pour la neutralisation par la soude avant l'addition de formol. L'opération est facilitée en effectuant simultanément deux dosages sur le même liquide et en comparant les teintes obtenues.

3° AZOTE AMMONIACAL. — Nous avons dosé l'azote ammoniacal au moyen du procédé à la cloche de SCHLOESING. W. MESTREZAT (136), (137) a récemment montré la valeur de cette méthode, lorsqu'on l'utilise pour le dosage de l'ammoniaque urinaire. Le lait de chaux à 20 pour 100 déplace totalement, en trois jours et à la température ordinaire, l'ammoniaque des sels ammoniacaux. Il n'agit pas sur l'urée, ni sur les acides aminés, mais il donne une très légère erreur par excès par suite de son action sur la créatinine et sur l'acide urique. Nous aurions pu atténuer cette cause d'erreur en substituant le carbonate de sodium à la chaux, mais comme la durée de l'opération est alors portée à cinq jours et que les quantités d'acide urique trouvées dans nos milieux sont assez faibles, nous avons préféré conserver la méthode originale. Nous avons utilisé, pour faire nos dosages, soit la cloche de SCHLOESING, soit le dessiccateur préconisé par MESTREZAT. Le mode opératoire est le suivant :

Une prise d'essai convenable, en général 30 centimètres cubes pour un milieu stérile et 20 centimètres cubes pour un bouillon cultivé, est placée dans un petit cristallisoir de 7 à 8 centimètres de diamètre. On dispose celui-ci sous une petite cloche reposant sur du mercure ou au fond d'un dessiccateur, dont le couvercle vaseliné ferme hermétiquement. Pour détruire les ferments solubles, qui peuvent exister dans les liquides ensemencés, on ajoute alors 2 centimètres cubes d'acide sulfurique au quart et on laisse reposer pendant 15 minutes. Au bout de ce temps, on verse dans le mélange 12 centimètres cubes d'un lait de chaux à 20 pour 100, on place au-dessus du cristallisoir une petite capsule renfermant 10 centimètres cubes de solution décimale d'acide sulfurique, on recouvre rapidement avec la cloche ou on referme le dessiccateur et on abandonne le tout pendant trois jours à la température du laboratoire.

Pour titrer l'acide combiné à l'ammoniaque dégagée, il suffit d'ajouter dans la capsule 10 centimètres cubes de solution décimale de soude, II ou III gouttes d'alizarine-sulfonate de sodium, et de titrer l'alcali en excès par la solution décimale d'acide sulfurique. En multipliant le nombre de centimètres cubes d'acide utilisé par 0,0014 on obtient, en gramme, la valeur de l'azote ammoniacal contenu dans la prise d'essai.

4° AZOTE AMINÉ. — L'azote aminé est obtenu, par différence, en retranchant l'azote ammoniacal, donné par le procédé à la cloche, de l'azote amino-ammoniacal obtenu par le procédé MESTREZAT.

5° BASES PURIQUES ET ACIDE URIQUE. — Nous avons dosé les bases puriques en employant la méthode classique de HAYCRAFT-DENIGÈS et en opérant de la même façon que pour l'urine. Les quantités trouvées sont faibles et le virage peu net. Le dosage de l'acide urique seul, par le procédé colorimétrique de GRIGAUT (88), donne également des chiffres très faibles, de l'ordre du centigramme par litre, de plus, lorsqu'on passe à l'étude des milieuxensemencés les teintes obtenues ne sont plus comparables à celles des étalons et le dosage devient impossible.

6° CRÉATINE ET CRÉATININE. — Dans quelques cas nous avons dosé la créatine et la créatinine en utilisant la méthode colorimétrique de JAFFÉ. La créatinine est évaluée directement, l'ensemble créatine + créatinine est dosé après hydrolyse à l'autoclave sous l'action de l'acide chlorhydrique normal, la différence entre ces deux résultats donne la créatine.

7° ESSAI DE PRÉCIPITATION FRACTIONNÉE DES PROTÉIDES. — Les méthodes de dosage précédemment exposées ne nous donnent aucune indication sur la quantité ou la nature des albumoses ou des peptones existant dans nos milieux. Elles ne nous fournissent aucun point de repère entre l'azote total d'une part et l'azote amino-ammoniacal de l'autre.

A. BERDNIKOW (12), (13) a essayé de remédier à cet inconvénient en établissant, à l'aide d'une série de réactifs précipitants, des coupures dans la chaîne des produits de dégradation des albuminoïdes.

Il utilise pour cela trois réactifs principaux :

a) une solution aqueuse à 10 pour 100 de tanin à l'alcool additionnée d'acide acétique et de sulfate de magnésium ;

b) une solution d'hydrate de fer colloïdal, analogue à celle préconisée par WUNSCHENDORFF (196), et obtenue en précipitant une solution de perchlorure de fer à demi-saturation par le carbonate de sodium puis en dialysant le mélange ;

c) une solution d'acide phosphotungstique à 40 pour 100.

Le milieu à examiner est traité de la façon suivante :

1° On dose d'abord l'azote total.

2° On ajoute à 500 centimètres cubes du milieu 250 centimètres cubes du réactif au tanin ; on laisse reposer 24 heures et on filtre. A 700 centimètres cubes du filtrat (correspondant à 466^{cm³}, 66 du liquide initial), on ajoute, en agitant énergiquement 35 centimètres cubes de lessive de soude, on filtre à nouveau et l'on détermine l'azote total sur 20 centimètres cubes du filtrat. La différence entre les deux dosages d'azote donne l'azote précipitable par le tanin qu'on exprimera en pour 100 de l'azote total.

3° On mélange 400 centimètres cubes du filtrat précédent (correspondant à 253^{cm³}, 91 du liquide initial) avec 200 centimètres cubes de la solution d'hydrate de fer colloïdal. Après 24 heures de contact on filtre. On mélange à nouveau 400 centimètres cubes du filtrat (correspondant à 169^{cm³}, 27 du liquide initial) à 200 centimètres cubes de solution de fer colloïdal et on

filtre après 24 heures. Enfin 400 centimètres cubes du filtrat (correspondant à 112^{cm³},85 du liquide initial) sont additionnés pour la troisième fois de 200 centimètres cubes de fer colloïdal et on filtre après 24 heures.

Dans 200 centimètres cubes de ce filtrat (correspondant à 37^{cm³},616 de liquide initial) on détermine l'azote total. Ce résultat permet de calculer l'azote précipitable par le fer après précipitation par le tanin, on l'exprime également en pour 100 de l'azote total.

4° La dernière précipitation par l'hydrate de fer colloïdal a éliminé les produits biurétiques. A 200 centimètres cubes du dernier filtrat, on ajoute 9^{gr},8 d'acide sulfurique et 44^{cm³},56 de la solution d'acide phosphotungstique. Après 24 heures de contact on filtre ou on décante le liquide complètement limpide. Dans les 200 centimètres cubes du filtrat (correspondant sensiblement à 30^{cm³},09 de liquide initial) on détermine une dernière fois l'azote total. On obtiendra ainsi directement l'azote non précipitable, et par différence l'azote précipitable par l'acide phosphotungstique après précipitation des produits biurétiques par le fer et par le tanin.

Cette méthode a donné à BERDNIKOW (13) de très bons résultats. Non seulement elle fournit des valeurs différentes pour divers milieux stériles, mais elle permet également de constater des différences dans le métabolisme de races différentes ou même de souches plus ou moins virulentes. C'est ainsi qu'en cultivant un certain nombre de bacilles dysentériques dans du bouillon peptoné ordinaire, cet auteur a obtenu les résultats suivants :

AZOTE POUR CENT DE L'AZ TOTAL DU BOUILLON.

	Az DES CORPS MICROBIENS	Az PRÉCIPITABLE par le tanin.	Az PRÉCIPITABLE PAR LE FER après le tanin	Az PRÉCIPITABLE PAR LE FER et le tanin (produits biurétiques).	Az PRÉCIPITABLE par l'acide phosphotungstique après le fer et le tanin.	Az NON PRÉCIPITABLE	Az VOLATIL	Az TOTAL DANS LES DIVERSES fractions.
Bouillon stérile..	0	51,9	24,3	76,2	6,0	17,7	0	99,5
Shiga toxique. . .	3,9	43,4	26,1	69,5	6,1	15,4	4,6	99,5
Shiga atoxique. . .	3,6	40,8	25,6	66,4	6,6	15,2	8,3	99,9
Flexner.	3,3	40,4	22,0	62,4	8,2	16,0	11,1	99,0
Bacille Y.. . . .	2,6	35,4	20,0	55,4	10,8	18,0	13,1	99,9

Dans ce tableau les bacilles sont rangés dans l'ordre de leur virulence décroissante. L'auteur fait remarquer que la quantité de l'ensemble des protides biurétiques dans le bouillon épuisé diminue au fur et à mesure que la virulence de l'organisme est moins prononcée, tandis que la quantité d'azote sous forme de polypeptides, d'acides aminés et de bases aminées augmente, comme le montrent les chiffres de la 5^e colonne. Il en est de même de l'azote volatil (bases aminées volatiles, ammoniacque et peut-être azote gazeux). Il en conclut que le pouvoir protéolytique d'un bacille dysentérique est d'autant plus marqué que son pouvoir toxique diminue davantage.

Les inconvénients de cette méthode sont assez nombreux. La préparation des réactifs est longue et pénible : le réactif au tanin doit macérer pendant deux ou trois semaines et la dialyse de l'hydrate de fer colloïdal demande au moins quinze jours, comme l'indique d'ailleurs WUNSCHENDORFF (196). Les précipitations successives s'échelonnent sur une durée d'au moins cinq jours et entraînent de très fortes dilutions. Enfin ce procédé nécessite une prise d'essai très importante qu'il peut être assez difficile de se procurer dans le cas de milieux ensemencés.

Nous avons cependant essayé de l'utiliser pour nos essais. Malheureusement, peut-être par suite de différences dans la nature du tanin employé, nous avons été obligé, pour obtenir un filtrat ne donnant plus la réaction du biuret, de faire subir au bouillon MARTIN jusqu'à 8 précipitations successives par l'hydrate de fer colloïdal. La méthode devient alors extrêmement longue et conduit à des dilutions considérables. En outre la concentration des liquides déséquilibrés à l'acide phosphotungstique et le dosage de l'azote total dans ces solutions sont rendus très difficiles par suite des projections qui tendent à se produire.

Nous avons donc été amenés finalement à abandonner cette méthode et nous n'avons dosé, en général, que l'azote total, l'azote amino-ammoniacal, l'azote ammoniacal et l'azote aminé. Nous savons bien que de cette façon nous laissons dans l'ombre les premières phases de la protéolyse, mais nous savons d'autre part que ces phases sont, pour nous, les moins intéressantes. Le microbe est, en effet, incapable d'assimiler directement les peptones ou les albumoses. Il devra d'abord décomposer ces substances complexes au moins en acides aminés (théorie de CZAPEK) et très probablement en ammoniaque et en sels ammoniacaux (théorie de DUCLAUX, de LOEW, de NÆGELI et de EHRLICH vérifiée notamment par D. BACH (8) pour la culture de *Aspergillus repens*, par E. AUBEL (6) et par A. GORIS et A. LIOT (84) pour le bacille pyocyanique).

Carbone.

Les bactéries trouvent généralement dans les protéides, les albumoses, les peptones et les amino-acides, dans les glucides et quelquefois dans les graisses le carbone indispensable à la constitution de leur protoplasme et à la production de l'énergie nécessaire pour leur multiplication et leur reproduction. Elles peuvent également utiliser d'autres substances : des acides (acétique, lactique, tartrique, pyruvique), des alcools (glycérol, mannitol), ou même parfois des composés très simples (CO_2 , CO et CH_4). Parmi toutes ces substances les glucides sont, avant tout, des producteurs d'énergie. L'addition d'un hydrate de carbone utilisable à un milieu de culture azoté modifie profondément la nature des produits formés au cours du métabolisme microbien. En général l'hydrate de carbone est utilisé pour la production de l'énergie et diminue considérablement l'attaque des composés azotés par les bactéries. De différentes analyses effectuées par

CRAMER, LYON, et d'autres auteurs, il semble résulter que l'addition d'hydrate de carbone à un milieu de culture modifie les proportions relatives des substances azotées, des extraits alcooliques ou éthérés et des cendres présentes dans les cellules bactériennes. Enfin l'influence favorisante du glucose sur la croissance microbienne est bien connue et A. BERTHELOT (14) a montré qu'une addition de 5 grammes de glucose par litre de bouillon augmente de 75 à 150 pour 100 la formation de la toxine tétanique.

Nous avons réservé pour plus tard cette étude de l'influence des matières sucrées. Nous avons simplement vérifié ici que tous nos milieux, après défécation au sous-acétate de plomb, ne réduisaient pas la liqueur de Fehling après trois minutes d'ébullition. Après avoir ainsi constaté l'absence de quantité notable de sucres réducteurs, nous avons procédé au microdosage du carbone total en utilisant la méthode de DESGREZ modifiée par LESCOEUR (124) (125).

Le principe de cette méthode est le suivant : les matières organiques, oxydées à chaud par le mélange sulfochromique en présence de chromate d'argent et d'un grand excès d'acide sulfurique, cèdent leur carbone sous forme de gaz carbonique. Celui-ci est entraîné, par un courant d'air exempt de gaz carbonique, dans une solution saturée d'hydrate de baryte dans laquelle il reste fixé à l'état de carbonate de baryum. Quand la température du mélange sulfochromique s'élève il se produit en outre un dégagement d'oxygène, provenant de la décomposition de l'acide chromique, et le gaz ainsi formé aide à balayer les dernières traces d'acide carbonique. Enfin, pour éviter que des traces de chlore provenant de la décomposition des chlorures viennent se condenser dans la baryte en provoquant une erreur par excès, on interpose, entre le mélange oxydant et la solution alcaline, un tube de ferrocyanure de potassium qui est transformé par le chlore sec en ferricyanure et en chlorure de potassium.

A la fin de la destruction sulfochromique la solution saturée d'hydrate de baryte est exempte d'hypochlorite et contient la totalité du carbone provenant de la prise d'essai. Elle peut renfermer également des quantités plus ou moins importantes d'acide sulfurique ou d'acide chlorhydrique qui ont été entraînées par le courant gazeux. Pour éviter cette cause d'erreur on traite la solution ainsi obtenue par un excès d'acide chlorhydrique dilué et froid. Dans ces conditions le gaz carbonique se dégage seul, on le fixe à nouveau dans une solution titrée de baryte dont l'abaissement du titre alcalimétrique mesurera la quantité de gaz carbonique formé. Le dosage comporte donc deux opérations distinctes : l'oxydation des matières organiques et la fixation du gaz carbonique d'une part, le dosage de ce gaz carbonique après rectification d'autre part. On opère de la façon suivante :

1° OXYDATION DE LA MATIÈRE ORGANIQUE ET FIXATION DU GAZ CARBONIQUE FORMÉ. — L'appareil utilisé comporte successivement :

a) Un flacon spécial renfermant de la chaux sodée granulée qui servira à décarbonater l'air arrivant dans l'appareil. Ce flacon est suivi d'un petit barboteur contenant de l'eau de baryte. Celui-ci servira de compte-bulles et de témoin de la décarbonatation. Son contenu devra rester parfaitement limpide jusqu'à la fin de l'opération.

b) Un flacon laboratoire constitué essentiellement par une petite fiole conique en pyrex, de 60 à 80 centimètres cubes environ, surmontée d'un condenseur à air de VIGREUX également en pyrex. La partie inférieure du condenseur est rodée et s'adapte exactement dans le col de la fiole conique. Le tube qui conduit l'air décarbonaté dans le flacon laboratoire débouche presque au fond de celui-ci. Il porte, un peu avant son arrivée dans cette partie de l'appareil, une ramification verticale fermée par un robinet. Ce robinet, surmonté lui-même par un entonnoir, servira à introduire la prise d'essai dans le flacon laboratoire.

c) A la sortie du condenseur les gaz passent dans un tube en U renfermant du ferrocyanure de potassium en grains, préalablement desséché à l'étuve.

d) L'appareil absorbeur d'acide carbonique est constitué par une éprouvette, bouchée à l'émeri et renfermant de l'eau de baryte saturée. Le gaz arrive dans celle-ci par un tube barboteur à serpentin. Ce tube barboteur possède également, à sa partie supérieure, une ramification verticale fermée par un robinet et terminée par un entonnoir. On dispose à la suite de cet appareil une petite fiole conique renfermant également de l'eau de baryte dans laquelle passeront les gaz dégagés et qui jouera le rôle de flacon absorbeur témoin.

e) L'extrémité de l'appareil est reliée à une trompe à eau par l'intermédiaire d'un dispositif spécial jouant le rôle de régulateur. Celui-ci est constitué par une éprouvette, remplie d'eau aux trois quarts de sa hauteur, et fermée par un bouchon de caoutchouc traversé par deux tubes *a* et *b*. La partie supérieure en T du tube *a* est reliée d'une part à l'appareil et d'autre part à la trompe à eau. Le tube *b* est droit, sa partie inférieure plonge dans l'eau de l'éprouvette et son extrémité supérieure reste en communication avec l'air extérieur. En enfonçant plus ou moins ce tube *b* on fait varier la pression intérieure, ce qui permet d'obtenir une circulation régulière des gaz dans le système absorbeur.

Le dosage est conduit de la façon suivante :

On place dans le flacon laboratoire 2 grammes d'un mélange pulvérisé renfermant 4 parties de bichromate de potassium pour 1 partie de chromate d'argent. Pour éviter l'introduction possible de matière organique ce mélange est pesé dans une coupelle métallique. On assure l'étanchéité de la fermeture à émeri en la recouvrant de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. On vérifie également les joints de caoutchouc qui, déjà passés au collodion, sont encore recouverts d'huile de vaseline.

On commence par purger l'appareil de gaz carbonique en reliant le tube en U à la trompe à eau et en faisant passer, pendant 10 minutes,

un courant d'air décarbonaté. On intercale alors dans le circuit le système absorbeur. L'appareil absorbeur proprement dit renferme 30 centimètres cubes d'eau de baryte saturée et le dernier flacon témoin contient 10 centimètres cubes d'une solution de baryte N/25 additionnée de chlorure de baryum. Les joints à l'émeri sont également recouverts de quelques gouttes d'eau bouillie.

On introduit alors, au moyen de l'entonnoir à robinet, la solution dans laquelle on veut doser le carbone. La prise d'essai ne devant pas renfermer plus de deux milligrammes de cet élément nous avons, en général, opéré sur 0^{cm3},25 mesurés à la pipette de CORNEC-COTTET (148'). Pour éviter l'introduction de gaz carbonique provenant de la respiration on surmonte cette pipette d'un tube renfermant de la chaux sodée. On rince ensuite l'entonnoir, d'abord avec un peu d'eau bidistillée bouillie, puis avec 20 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré qu'on fait également passer dans le flacon laboratoire. On règle alors l'aspiration de façon que l'air passe bulle à bulle dans le petit barboteur placé au commencement de l'appareil et on chauffe le flacon laboratoire à l'aide d'un micro-brûleur. Au bout de 5 minutes la réaction est assez vive et on observe un dégagement d'oxygène. Si celui-ci est trop abondant on aura avantage à modérer le chauffage. En général la baryte de l'appareil absorbeur commence à se troubler 10 minutes après le début de l'opération. On prolonge celle-ci pendant une demi-heure. Au bout de ce temps on arrête le chauffage, on laisse légèrement refroidir, et on achève d'entraîner les dernières traces de gaz carbonique en augmentant la vitesse du courant d'air qui traverse l'appareil. Le courant d'air décarbonaté doit être maintenu pendant 10 minutes.

2° DOSAGE DU GAZ CARBONIQUE. — L'appareil absorbeur d'acide carbonique est introduit, en même temps qu'une petite fiole conique jouant le rôle de nouveau flacon absorbeur, dans un appareil à circulation continue pour l'absorption des gaz en circuit fermé. Le tout constitue un système entièrement clos, l'organe moteur, qui force les gaz à repasser sans cesse dans la solution absorbante jusqu'à fixation complète, est constitué par une petite trompe à mercure. Les gouttelettes de métal, en tombant dans un tube de diamètre calculé, aspirent le gaz au-dessus d'elles, le refoulent au-dessous, et se comportent ainsi comme une série de pistons dont les effets s'ajoutent pour déplacer le gaz d'une façon continue. La fiole conique renferme 10 centimètres cubes d'une solution sensiblement N/25 d'hydrate de baryte mesurés très exactement à l'aide d'une burette automatique. Cette liqueur est préparée en partant d'une solution saturée d'hydrate de baryum, on l'additionne de 50 grammes de chlorure de baryum par litre et on la conserve à l'abri du gaz carbonique de l'air. La présence de chlorure de baryum rend possible le dosage acidimétrique exact d'un excès de baryte en présence de carbonate de baryum. L'appareil étant complètement monté on vérifie l'étanchéité des raccords

de caoutchouc, on les recouvre d'huile de vaseline, et on assure la fermeture hermétique des joints à l'émeri en les recouvrant de quelques gouttes d'eau bouillie. On fait alors passer, à l'aide du tube à entonnoir, 5 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à 1/3 dans l'appareil absorbeur d'acide carbonique et on fait fonctionner la trompe à mercure. CO^2 dégagé est forcé de passer dans la fiole conique où il est fixé par la baryte titrée. L'expérience montre que la totalité du gaz carbonique est pratiquement absorbée par la baryte au bout de 20 minutes, cependant, pour éviter une fixation incomplète, on maintient pendant une demi-heure la circulation des gaz. Au bout de ce temps on détache la fiole conique du circulateur, on y verse V gouttes de solution alcoolique de phénolphtaléine et on titre l'alcali en excès par une solution N/50 d'acide chlorhydrique très exactement préparée.

Calcul et correction. — Si on désigne par n le nombre de centimètres cubes d'acide chlorhydrique utilisé pour obtenir le virage et par N le nombre de centimètres cubes du même acide nécessaire pour neutraliser un échantillon de baryte égal à celui qui a été introduit dans l'appareil, les deux dosages étant effectués en même temps et dans des fioles semblables, la différence $N - n$ mesure la perte d'alcalinité résultant de la fixation du gaz carbonique.

Chaque centimètre cube de la solution N/50 d'acide chlorhydrique correspond à $0^{\text{mgr}},44$ de CO^2 ou à $0^{\text{mgr}},12$ de carbone. La quantité de cet élément contenue dans la prise d'essai est donc égale à

$$(N - n) \times 0,12 \text{ milligrammes.}$$

Le dosage ainsi conduit donne un résultat un peu trop élevé. D'une part l'air contenu dans l'appareil absorbeur d'acide carbonique au moment de l'oxydation sulfochromique ou dans le circulateur renferme une petite quantité de CO^2 et d'autre part les réactifs, et en particulier l'acide sulfurique, renferment toujours des traces de carbone. Une expérience à blanc, conduite exactement suivant la technique générale, permet d'établir globalement un terme correctif c , exprimé en centimètres cubes d'HCl N/50, tenant compte de ces deux erreurs par excès.

Le carbone contenu dans la prise d'essai est alors donné par la relation $C = (N - n - c) \times 0,12$ milligrammes.

Pendant la destruction de la matière organique une petite quantité de gaz carbonique peut échapper à l'appareil absorbeur et venir se condenser dans le flacon témoin. Comme celui-ci renferme un volume connu de baryte titrée, on pourra y déterminer directement, par titrage acidimétrique, la quantité de CO^2 ainsi fixée et l'ajouter au résultat général.

Nous rapportons ici un exemple numérique :

prise d'essai : $0^{\text{cm}^3},2507$;

$$N = 29^{\text{cm}^3},9, \quad n = 15^{\text{cm}^3},25, \quad c = 4^{\text{cm}^3},65 \quad N - n - c = 10^{\text{cm}^3}.$$

L'acide chlorhydrique utilisé avait pour titre exact N/50 $\times 0,898$.

Le carbone contenu dans la prise d'essai était égal à :

$$10^{\text{cm}^3} \times 0,12 \times 0,898 = 1^{\text{mgr}}, 0776.$$

Par suite le liquide étudié renfermait par litre :

$$\frac{1,0776 \times 1000}{0,2507} = 4298 \text{ milligrammes de carbone } ^1.$$

Phosphore.

Le phosphore constitue un élément essentiel des organismes vivants. On le rencontre dans tous les tissus et sous les formes les plus diverses. Il existe dans tous les noyaux sous forme de nucléo-protéïdes et, par là, joue un rôle primordial dans la division cellulaire.

Le phosphore se rencontre relativement en très fortes proportions chez les bactéries. En comparant les résultats de différents auteurs, BUCHANAN et FULMER (29) font remarquer que cet élément, calculé en P_2O_5 , constitue de 10 à 45 pour 100 des cendres chez les bactéries vraies, de 43 à 74 pour 100 chez les microbes acido-résistants et de 47 à 59,4 pour 100 chez les levures.

Parmi tous les composés du phosphore les phosphates jouent un rôle très important. Ils constituent une bonne source de cet élément pour pratiquement tous les microorganismes et on les utilise presque universellement pour la préparation des milieux chimiquement définis dans lesquels il servent, à la fois, d'aliment et de tampon.

Dans le cas du bacille pyocyanique, GESSARD a montré que la production du pigment fluorescent était liée à la présence de phosphates. La même constatation a été faite par LIOT.

Plus récemment A. FROUIN et M^{lle} M. GUILLAUMIE (73), en étudiant le développement du bacille tuberculeux dans un milieu synthétique, ont observé que lorsque la proportion de phosphate monopotassique contenue dans le milieu passe de 1 à 5 puis 10 et enfin 20 pour 1000 le poids des microbes secs, fournis par 100 centimètres cubes de liquide, passe de 0^{gr},217 à 0^{gr},341 puis 0^{gr},467 et enfin à 0^{gr},649. Enfin A. BERTHELOT et ses collaborateurs (14) ont montré également l'influence favorisante des phosphates monobasiques de potassium ou de sodium sur la formation de la toxine tétanique.

Dans nos essais nous avons simplement dosé les phosphates et le phosphore total.

La détermination des phosphates a été faite en employant la méthode classique à l'azotate d'urane et en opérant exactement comme pour le dosage des phosphates urinaires. L'indicateur employé était la teinture de cochenille.

1. Nous tenons à remercier particulièrement M. DELAVILLE qui a bien voulu mettre à notre disposition le matériel nécessaire à ces dosages.

Nous avons dosé le phosphore total au moyen de la méthode de H. COPAUX (42'), modifiée par M^{me} H. HINGLAIS (107), (108) en vue de son utilisation pour le dosage de petites quantités de phosphore. Cette méthode, qui nous a donné d'excellents résultats, repose sur le principe suivant : Une solution d'un phosphate, additionnée d'un acide minéral et agitée en présence d'éther avec un molybdate alcalin, donne lieu à la formation d'acide phospho-molybdique qui s'unit à l'éther et à l'eau pour constituer un complexe liquide, de couleur jaune et de densité élevée, susceptible d'être séparé par centrifugation. La composition de ce liquide est assez constante, et sa teneur en phosphore est assez faible par rapport à son volume, pour que de la mesure de celui-ci on puisse déduire, avec suffisamment d'exactitude, la quantité de phosphore qui s'y trouve contenue. Un milligramme de P_2O_5 , soit 0^{mg}₄₃₆ de P, occupe, sous cette forme, un volume égal à 1/20 de centimètre cube. Le dosage du phosphore comportera d'abord la destruction de la matière organique et la minéralisation du phosphore, puis la formation du complexe et la mesure de son volume.

1^o DESTRUCTION DE LA MATIÈRE ORGANIQUE. — La destruction de la matière organique est effectuée par la méthode sulfonitrique.

25 centimètres cubes, ou plus rarement 50 centimètres cubes, de milieu nutritif sont placés dans un matras de Kjeldahl de 300 centimètres cubes en pyrex et concentrés à 1 ou 2 centimètres cubes environ, en chauffant très doucement sur une toile métallique et en agitant continuellement le matras vers la fin de l'évaporation. On laisse refroidir, on ajoute 10 centimètres cubes d'acide azotique concentré et pur, on agite, on couvre le ballon et on laisse reposer pendant 24 heures. On verse alors dans le matras 2 centimètres cubes d'acide sulfurique pur et on procède à la destruction sulfonitrique. Pour cela, le matras étant placé en position inclinée, on commence à chauffer très doucement pour éviter des pertes possibles de phosphore. Des vapeurs nitreuses se dégagent, le liquide d'abord coloré en brun s'éclaircit assez rapidement et peut même devenir à peu près incolore. Le chauffage continuant des vapeurs blanches commencent à apparaître et on constate, en même temps ou même parfois un peu après, un nouveau brunissement du mélange. Dès l'apparition des premières fumées blanches on ajoute dans le matras, sans interrompre le chauffage, de 3 à 5 centimètres cubes d'acide azotique. Celui-ci est versé goutte à goutte en ayant soin de faire glisser les gouttes le long du col du ballon. On continue le chauffage, l'acide nitrique s'élimine peu à peu et, lorsque des vapeurs blanches tendent à se reformer, on procède à une nouvelle addition d'acide azotique. On renouvelle l'opération jusqu'à décoloration du liquide. Dans nos essais nous avons eu recours, selon la nature des milieux, à 2, 3 ou 4 additions successives d'acide azotique. Après la dernière addition on continue encore quelque temps le chauffage pour éliminer la majeure partie de l'acide azotique. L'opération terminée, on laisse refroidir, on ajoute quelques centimètres cubes d'eau et on porte le mélange à l'ébullition pour éliminer les dernières traces

d'acide azotique et rester en milieu sulfurique. Suivant la richesse de la prise d'essai en phosphore, on fait passer le contenu du matras et les eaux de lavage dans un ballon jaugé de 20 ou de 50 centimètres cubes, on complète au trait de jauge et on effectue le dosage sur 10 centimètres cubes de la solution. Pour la commodité des lectures, il est préférable que ces 10 centimètres cubes renferment de 1 à 2 milligrammes de phosphore mais ces quantités sont loin de constituer des limites.

La destruction peut être effectuée dans un temps compris entre 3 heures et 5 heures au maximum. Il faut la conduire avec toutes les précautions indiquées par M^{me} HINGLAIS et, en particulier, éviter toute surchauffe et tout dégagement hors du matras de vapeurs denses d'acide sulfurique qui pourraient entraîner du phosphore. Nous nous sommes assurés, qu'en opérant dans ces conditions, un phosphate métallique ajouté à un milieu avant la destruction sulfo-nitrique se retrouve intégralement à la fin de l'opération.

2° DOSAGE DU PHOSPHORE. — Le dosage est effectué dans une ampoule analogue à celle utilisée par H. COPAUX. L'ouverture peut être facilement obturée avec le pouce, la portion renflée a une capacité de 45 centimètres cubes environ et la partie inférieure, cylindrique et fermée à son extrémité, est graduée en $1/80$ de centimètre cube.

En dehors de certaines limites, le volume du complexe n'étant pas rigoureusement proportionnel à la quantité de phosphore qu'il contient et, d'autre part, les graduations de l'ampoule pouvant être plus ou moins exactes, il est préférable d'étalonner d'abord l'appareil en effectuant une série de dosages à partir d'une solution de phosphate titrée. Les réactifs à employer comprennent :

a) Une solution étalon de phosphate mono-ammoniacal dont 1 centimètre cube renferme un milligramme de phosphore.

Cette solution, plus ou moins diluée, servira à graduer l'ampoule.

b) Une solution de molybdate de sodium obtenue en faisant dissoudre 140 grammes de ce sel dans une quantité d'eau distillée suffisante pour faire un litre.

c) Une solution sulfurique renfermant 200 grammes d'acide sulfurique concentré dans une quantité d'eau distillée suffisante pour faire un litre.

d) De l'éther exempt d'alcool.

Pour graduer l'ampoule on introduit dans celle-ci :

10 centimètres cubes de la solution titrée de phosphate ;

10 centimètres cubes de liqueur sulfurique ;

10 centimètres cubes d'éther.

On agite, en bouchant l'extrémité de l'ampoule avec le pouce, puis on ajoute :

10 centimètres cubes de solution de molybdate de sodium, par fractions successives de 3 centimètres cubes environ, en agitant énergiquement après chaque addition.

On centrifuge pendant environ une minute, pour bien rassembler tout le complexe dans la partie inférieure, et on note la graduation correspondant à la quantité de phosphore utilisée. On répétera la même opération pour des quantités de phosphore comprises entre $0^{\text{mgr}},2$ et 3 milligrammes et différentes les unes des autres de $0^{\text{mgr}},2$.

Le dosage du phosphore dans le produit de la destruction sulfo-nitrique s'effectue d'une façon identique, lorsqu'on opère sur 10 centimètres cubes de la solution obtenue en complétant à 50 centimètres cubes le contenu du matras de Kjeldahl. Si, au contraire, on utilise pour le dosage la moitié du liquide résultant de la destruction (10 centimètres cubes de la solution obtenue en complétant seulement à 20 centimètres cubes le contenu du matras), on évitera l'introduction d'un excès d'acide en remplaçant les 10 centimètres cubes de liqueur sulfurique par une quantité égale de cette même liqueur diluée à moitié. Dans ces conditions le complexe se rassemble très facilement et la lecture de son volume ne présente aucune difficulté.

Exemple numérique. — Nous avons fait 3 destructions sulfo-nitriques à partir de 25 centimètres cubes de bouillon MARTIN. Pour chaque essai le volume final a été amené à 50 centimètres cubes et le dosage du phosphore a été effectué sur 10 centimètres cubes de cette dilution. Tous les essais ont donné, pour le volume du complexe, 18 divisions de l'ampoule. La graduation de celle-ci avait montré que 16,6 divisions correspondaient à 2 milligrammes de phosphore, tandis que 18,3 divisions en représentaient $2^{\text{mgr}},2$.

Par suite 5 centimètres cubes de bouillon MARTIN renferment $2^{\text{mgr}},164$ de phosphore et un litre contiendra $0^{\text{gr}},4328$ de cet élément.

Soufre.

Le soufre est considéré comme un élément nécessaire au développement microbien. Cependant M. NICOLLE (149) indique que beaucoup de bactéries peuvent s'en passer sans dommage. En ce qui concerne plus particulièrement le bacille pyocyanique, A. FROUIN et M^{lle} M. GUILLAUMIE (74) et E. AUBEL (6) concluent à la nécessité de cet élément pour la culture de ce bacille.

Nous avons essayé de doser le soufre dans les milieux de culture en utilisant la méthode volumétrique à la benzidine.

La méthode classique, indiquée pour la détermination des différentes formes du soufre urinaire (91), ne nous a donné aucun résultat.

Nous avons ensuite utilisé la technique proposée par A. LESURE et A. DUNEZ (126) mais celle-ci ne nous a pas encore donné complète satisfaction.

Finalement nous avons employé le mode opératoire mis au point par M. CHATRON (36).

La solution de chlorhydrate de benzidine est obtenue en délayant

4 grammes de benzidine pulvérisée dans 150 centimètres cubes d'eau et en ajoutant, goutte à goutte, 50 centimètres cubes d'acide chlorhydrique normal de façon à obtenir une dissolution totale. On complète alors à 250 centimètres cubes avec de l'eau distillée et on filtre.

La précipitation des sulfates par la solution de chlorhydrate de benzidine est faite à un pH compris entre 2,5 et 3 et en présence d'acétone. Pour cela on additionne 5 centimètres cubes de la solution renfermant les sulfates à doser de II gouttes d'une solution de bleu de bromophénol. On ajoute alors un peu de soude diluée, si cela est nécessaire, pour obtenir le virage au bleu de l'indicateur puis, par addition d'acide chlorhydrique, on provoque le virage en sens inverse et on s'arrête à la première teinte jaune. On ajoute alors 8 centimètres cubes d'acétone et 2 centimètres cubes de la solution de chlorhydrate de benzidine, on agite, les sulfates précipitent et on laisse la précipitation s'effectuer pendant 5 minutes au minimum.

Le précipité est recueilli sur un petit filtre de verre poreux (verre d'Iéna 10 G 4). On le lave à cinq reprises successives avec chaque fois quelques centimètres cubes d'acétone renfermant 1/10 de son volume d'eau, puis on termine par un dernier lavage avec 4 centimètres cubes d'alcool-éther. Enfin on aura avantage, au cours des premiers lavages, à remettre chaque fois le précipité en suspension dans le liquide en le décollant du filtre à l'aide d'une petite baguette de verre. Pour faciliter l'hydrolyse ultérieure du sulfate de benzidine, on aura soin d'éviter la dessiccation du précipité à l'air.

Quand le lavage est terminé, on place le filtre et le précipité dans un « bécher », et on recouvre le tout d'eau distillée bouillante déjà neutralisée à la soude en présence de phénolphthaléine. On porte alors le liquide à l'ébullition et on fait tomber goutte à goutte dans le mélange de la soude N/50 jusqu'à hydrolyse complète du précipité et virage au rose de la phénolphthaléine. Chaque centimètre cube de soude N/50 correspond à 0^{gr},00032 de soufre.

Nous avons utilisé ce mode opératoire pour le dosage du soufre total.

La destruction des matières organiques en milieu liquide par l'acide chlorhydrique et le chlorate de potasse ne nous a pas donné satisfaction. La destruction par l'acide azotique et le perhydrol, préconisée par LESURE et DUNEZ (126), et la destruction par l'acide azotique et l'acide perchlorique, proposée par LEMATTE, BOINOT et KAHANE (122) paraissent donner des résultats comparables. Nous avons préféré le second procédé qui semble plus rapide.

Une prise d'essai de 10 à 25 centimètres cubes de bouillon nutritif est concentrée à 1 ou 2 centimètres cubes en la chauffant très doucement dans un petit matras de Kjeldahl. On ajoute 6 centimètres cubes d'acide azotique fumant, 1^{cm3},5 d'acide perchlorique (densité = 1,615) et on laisse en repos pendant une demi-heure. On chauffe ensuite, d'abord très doucement jusqu'à ce qu'il ne se dégage plus de vapeurs nitreuses, puis un peu

plus fort jusqu'à décoloration complète du liquide et apparition des premières vapeurs blanches. La destruction demande 1 heure à 1 heure et demie. On laisse refroidir, on reprend par l'eau tiède et on transvase dans un « bécher ». Le liquide est évaporé au bain-marie bouillant, en ayant soin d'ajouter quelques gouttes d'acide chlorhydrique vers la fin de l'opération pour chasser les dernières traces d'acide azotique.

Les cristaux formés sont dissous dans 5 centimètres cubes d'acide sulfurique N/50 et on dose, dans la solution ainsi obtenue, les sulfates par la méthode précédemment exposée. Avant de faire le calcul on retranche du nombre de centimètres cubes trouvé pour la soude les 5 centimètres cubes correspondant à l'acide sulfurique ajouté.

Il nous a semblé en effet que les dosages étaient plus réguliers lorsque la proportion des sulfates était assez importante par rapport aux autres sels. C'est pour cette raison que nous ajoutons toujours 5 centimètres cubes de SO_4H_2 N/50, et que nous choisissons la prise d'essai de façon que le volume total de NaOH N/50 utilisé dans le dosage soit voisin de 10 centimètres cubes.

Bien entendu on s'assurera par un essai à blanc que les réactifs utilisés pour la destruction de la matière organique (acide perchlorique ou surtout perhydrol) ne renferment pas de soufre.

Chlore.

On considère généralement que le chlorure de sodium est nécessaire à la majorité des bactéries. Ce sel, ajouté aux milieux de culture, peut être utilisé comme aliment mais il agit surtout en modifiant la pression osmotique des liquides nutritifs. Certains organismes ne se développent bien que dans des solutions possédant une haute pression osmotique et c'est ainsi que D. BACH (8) a montré que l'*Aspergillus repens* ne se multiplie rapidement qu'en présence de 5 pour 100 de chlorure de sodium.

Le chlorure de sodium contenu dans les milieux de culture peut avoir trois origines différentes :

- a) chlorure de sodium apporté par les éléments servant à la préparation des milieux (macération de viande ou peptone) ;
- b) chlorure de sodium formé au cours de la préparation (neutralisation de la solution chlorhydrique de peptone dans le bouillon MARTIN par exemple) ;
- c) chlorure de sodium ajouté avant la stérilisation.

Ces quantités étant plus ou moins bien déterminées, nous avons dosé, dans nos milieux, les chlorures par la méthode de CHARPENTIER-VOLHARD, en ayant soin d'éliminer le chlorure d'argent formé avant d'ajouter le sulfocyanate, et le chlore total suivant la technique de LAUDAT (119).

Ces méthodes ne pourront nous renseigner sur la quantité de chlore fixée par les bactéries que si cette quantité est relativement assez importante. Nous reprendrons plus tard cette étude en utilisant des milieux non salés, c'est-à-dire dans lesquels on n'aura pas ajouté 5 pour 1 000 de chlo-

rure de sodium, ce qui nous permettra d'utiliser des techniques plus sensibles analogues à celle proposée par H. HINGLAIS (106) par exemple.

Nous avons fait tous nos dosages en double. Les résultats ont toujours été concordants sauf parfois pour le dosage du soufre total. Dans ce cas nous avons procédé à un troisième dosage et nous avons pris la moyenne des deux résultats les plus voisins. En particulier nous avons toujours fait en double, et même en triple, les destructions sulfuriques ou nitro-sulfuriques pour le dosage de l'azote total ou du phosphore total.

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Avant d'examiner la composition des milieux de culture nous avons voulu voir jusqu'à quel point la coagulation des albumines, pendant la préparation des macérations de viande, diminuait la teneur en matières nutritives des bouillons et si le chauffage à l'autoclave modifiait la constitution des milieux de culture.

Influence de la coagulation des albumines sur la composition des macérations de viande.

Nous avons dosé l'azote dans la première macération de viande simplement filtrée au papier, aussitôt après en avoir séparé la viande par expression, et dans la même macération portée à l'ébullition, filtrée et stérilisée à l'autoclave. Nous avons répété les mêmes dosages pour la deuxième macération de viande et nous avons obtenu les résultats suivants :

	PREMIÈRE MACÉRATION DE VIANDE		DEUXIÈME MACÉRATION DE VIANDE	
	filtrée mais non chauffée.	après coagulation, filtration et stérilisation.	filtrée mais non chauffée.	après coagulation, filtration et stérilisation.
Tension superficielle 5 cm ³ =	125 gouttes	121 gouttes	117,5 gouttes	117 gouttes
Az total (par litre)	3 ^{gr} , 16	1 ^{gr} , 34	0 ^{gr} , 62	0 ^{gr} , 38
Az amino-ammoniacal (par litre)	0 ^{gr} , 31	0 ^{gr} , 27	0 ^{gr} , 10	0 ^{gr} , 08
Az ammoniacal (par litre)	0 ^{gr} , 11	0 ^{gr} , 09	0 ^{gr} , 04	0 ^{gr} , 04
Az aminé (par litre)	0 ^{gr} , 20	0 ^{gr} , 18	0 ^{gr} , 06	0 ^{gr} , 04
Créatine + Créatinine	1 ^{gr} , 07	0 ^{gr} , 97		0 ^{gr} , 28
Créatinine	0 ^{gr} , 08	0 ^{gr} , 60		0 ^{gr} , 10
Créatine	0 ^{gr} , 99	0 ^{gr} , 37		0 ^{gr} , 18

La coagulation des albumines par la chaleur et leur élimination par filtration semble pratiquement sans influence sur la teneur des macérations

en azote ammoniacal et en azote aminé. Elle provoque par contre une diminution considérable de la teneur en azote total et cette perte, qui pour la première macération de viande est voisine de 60 pour 100, porte presque uniquement sur les substances protéiques complexes.

Pour éviter cette coagulation massive, qui évidemment est extrêmement nuisible à la qualité du produit, A. BERCZELLER (11) chauffe simplement la macération de viande à 60° pendant une demi-heure. Il la filtre ensuite au papier, puis à la bougie, et il obtient ainsi un liquide transparent d'un rouge vif auquel on pourra incorporer soit de la gélose fondue, soit de la peptone MARTIN. Le milieu ainsi obtenu permet la culture du gonocoque, du bacille de Pfeiffer et du bacille de la coqueluche.

Influence de la stérilisation à l'autoclave sur la composition des milieux.

Nous avons comparé, d'une part, une eau peptonée obtenue par simple dissolution de la peptone dans l'eau, dissolution suivie d'une très courte ébullition, avec la même eau peptonée stérilisée une fois à l'autoclave et, d'autre part, un bouillon à l'extrait de viande LIEBIG, préparé par simple solution de l'extrait de viande, de la peptone et du chlorure de sodium dans l'eau, avec le même bouillon stérilisé trois fois à l'autoclave sans précautions spéciales. Les résultats sont donnés par le tableau suivant :

	BOUILLON LIEBIG		EAU PEPTONÉE	
	NON CHAUFFÉ	STÉRILISÉ 3 FOIS	APRÈS ébullition.	APRÈS 1 stérilisation.
Tension superficielle 5 cm ³ =	124,5 gouttes	126 gouttes	119,5 gouttes	118,5 gouttes
Az total (par litre). . .	3 ^{gr} ,598	4 ^{gr} ,046	1 ^{gr} ,428	1 ^{gr} ,484
Az amino-ammoniacal (par litre).	0 ^{gr} ,720	0 ^{gr} ,848	0 ^{gr} ,339	0 ^{gr} ,367
Az ammoniacal (par litre).	0 ^{gr} ,091	0 ^{gr} ,133	0 ^{gr} ,059	0 ^{gr} ,07
Az aminé (par litre). . .	0 ^{gr} ,629	0 ^{gr} ,715	0 ^{gr} ,28	0 ^{gr} ,30
Bases puriques (en acide urique) (par litre). . .	0 ^{gr} ,27	0 ^{gr} ,39	0 ^{gr} ,08	0 ^{gr} ,12
Acide urique (par litre). .			0 ^{gr} ,02	0 ^{gr} ,02
Créatine + Créatinine (par litre).	0 ^{gr} ,58	0 ^{gr} ,64	0 ^{gr} ,049	0 ^{gr} ,053
Créatinine (par litre). . .	0 ^{gr} ,34	0 ^{gr} ,48	0 ^{gr} ,04	0 ^{gr} ,04
Créatine (par litre). . .	0 ^{gr} ,24	0 ^{gr} ,16	0 ^{gr} ,009	0 ^{gr} ,013
Phosphates (en P ₂ O ₅) (par litre).	0 ^{gr} ,68	0 ^{gr} ,74	0 ^{gr} ,09	0 ^{gr} ,09

Nous voyons donc que la stérilisation à l'autoclave peut provoquer une légère concentration des liquides mis en œuvre. Si cette concentration

semble pratiquement négligeable lorsqu'on effectue un seul chauffage, il n'en est plus de même lorsqu'on procède à plusieurs stérilisations successives sans précautions spéciales (chauffage dans des « boîtes à lait » par exemple). En effet, l'hydrolyse de la créatine mise à part, nous constatons que les chiffres relatifs aux composés azotés du bouillon LIEBIG stérile sont supérieurs d'au moins 12 pour 100 aux chiffres correspondants du même bouillon non chauffé.

Au cours de nos essais nous avons pesé parfois nos matras avant et après la stérilisation et nous avons noté des concentrations de l'ordre de 2 à 3 pour 100.

Des observations du même genre avaient déjà été faites par KIESEL (112). Dans un article cet auteur s'exprime en effet de la façon suivante : « Il était impossible de stériliser les liquides mesurés ou titrés dans des tubes ou matras bouchés au coton sans avoir un changement assez grand de volume et de concentration des liquides, changement encore différent pour des tubes placés au milieu et sur le pourtour du panier contenant les tubes. »

Avant de passer à l'étude particulière des milieux de culture nous tenons à insister sur les deux faits suivants :

a) les procédés ordinaires de préparation des bouillons avec coagulation par ébullition éliminent une très grande partie, près de 60 pour 100, des substances nutritives les plus importantes ;

b) des chauffages successifs effectués à l'autoclave peuvent amener une concentration sensible des milieux. Ce phénomène est, bien entendu, tout à fait indépendant de la production de substances empêchantes, substances qui peuvent se former lorsqu'on stérilise à haute température un bouillon renfermant, par exemple, des matières sucrées.

Composition des milieux de culture.

Nous pouvons maintenant, à l'aide des tableaux suivants, comparer la teneur en matières nutritives des milieux de culture utilisés.

Le bouillon peptoné n° I a été obtenu en ajoutant à la première macération de viande n° I la quantité de peptone utilisée pour la préparation de l'eau peptonée n° I. Le bouillon peptoné n° II a été obtenu de la même façon. Les dosages montrent bien que ces bouillons renferment la somme des éléments nutritifs contenus dans les deux constituants avec cependant une certaine concentration, produite par les différents chauffages et par une évaporation possible au cours de la filtration des liquides chauds.

Si les deux macérations de viande et les deux bouillons préparés par nous présentent une composition à peu près semblable, il n'en est plus de même si on modifie le mode de préparation ou si on utilise de la viande ou de la peptone d'une autre origine.

	EAU PEPTONÉE n° I.	PREMIÈRE MACÉRATION de viande n° I.	BOUILLON PEPTONÉ salé n° I.	EAU PEPTONÉE n° II.	PREMIÈRE MACÉRATION de viande n° II.	BOUILLON PEPTONÉ salé n° II.
Tension superficielle 5 cm ³	= 118,5 gouttes	121 gouttes	130,5 gouttes	118,5 gouttes	122,5 gouttes	129,5 gouttes
Déviatiou polarimétrique (l = 1)	— 34' 2	— 5'	— 41'	— 27'	— 5'	— 30' 2
Az total (par litre). . . .	1 ^{gr} ,484	1 ^{gr} ,34	3 ^{gr} ,192	1 ^{gr} ,516	1 ^{gr} ,73	3 ^{gr} ,628
Az amino-ammoniacal (par litre).	0 ^{gr} ,367	0 ^{gr} ,27	0 ^{gr} ,707	0 ^{gr} ,36	0 ^{gr} ,326	0 ^{gr} ,756
Az ammoniacal (par litre).	0 ^{gr} ,07	0 ^{gr} ,09	0 ^{gr} ,161	0 ^{gr} ,06	0 ^{gr} ,084	0 ^{gr} ,154
Az aminé (par litre).. . .	0 ^{gr} ,297	0 ^{gr} ,18	0 ^{gr} ,546	0 ^{gr} ,30	0 ^{gr} ,242	0 ^{gr} ,602
Rapport						
Az amino-ammoniacal . .	0,24	0,20	0,22	0,23	0,18	0,20
Az total						
C total (par litre). . . .				4 ^{gr} ,30	4 ^{gr} ,655	9 ^{gr} ,597

Nous donnons ci-dessous l'analyse d'une macération de viande, préparée par macération de 24 heures à la température de 37°, et l'analyse d'un bouillon peptoné salé (bouillon n° IV) préparé aux Travaux Pratiques de la Faculté de Pharmacie.

	PREMIÈRE MACÉRATION de viande préparée à 37°.	BOUILLON PEPTONÉ salé n° IV.
Tension superficielle 5 cm ³	= 136 gouttes	127,5 gouttes
Az total (par litre).	1 ^{gr} ,75	2 ^{gr} ,87
Az amino-ammoniacal (par litre).	0 ^{gr} ,933	0 ^{gr} ,54
Az ammoniacal (par litre)..	0 ^{gr} ,64	0 ^{gr} ,14
Az aminé (par litre).	0 ^{gr} ,29	0 ^{gr} ,40
Rapport $\frac{\text{Az amino-ammoniacal}}{\text{Az total}}$	0,53	0,18

La macération préparée à 37° renferme beaucoup plus d'ammoniaque qu'une macération faite à la température ordinaire, en partant d'une viande de qualité semblable. En même temps la tension superficielle est plus faible pour la première macération que pour la seconde. Ces deux phénomènes (formation d'ammoniaque et diminution de la tension superficielle) sont évidemment en liaison avec la protéolyse, microbienne ou même autolytique, qui s'établit rapidement à 37°.

Le bouillon n° IV est un peu moins riche que les nôtres en Az total et surtout en Az aminé.

La comparaison des autres milieux nous donne les résultats suivants :

	BOUILLON MARTIN		BOUILLON LIEBIG			DEUXIÈME MACÉRATION de viande.	
	n° I.	n° II.	n° I.	n° II.	n° III.	n° I.	n° II.
Tension superficielle 5 cm ³	135 gouttes	137 gouttes	127 gouttes	126 gouttes	127 gouttes	117 gouttes	
Déviation polarimétrique (l = 1)		— 1° 2'	— 1° 32'	— 1° 4'		— 4'	
Az total (par litre). . .	2 ^{gr} ,548	3 ^{gr} ,05	4 ^{gr} ,154	4 ^{gr} ,046	4 ^{gr} ,083	0 ^{gr} ,38	0 ^{gr} ,494
Az amino-ammoniacal (par litre).	0 ^{gr} ,695	0 ^{gr} ,581	0 ^{gr} ,989	0 ^{gr} ,848	0 ^{gr} ,852	0 ^{gr} ,08	0 ^{gr} ,107
Az ammoniacal (par litre).	0 ^{gr} ,399	0 ^{gr} ,246	0 ^{gr} ,119	0 ^{gr} ,133	0 ^{gr} ,120	0 ^{gr} ,04	0 ^{gr} ,029
Az aminé (par litre). .	0 ^{gr} ,296	0 ^{gr} ,335	0 ^{gr} ,87	0 ^{gr} ,715	0 ^{gr} ,732	0 ^{gr} ,04	0 ^{gr} ,078
Rapport Az amino-ammoniacal Az total	0,27	0,19	0,23	0,20	0,20	0,21	0,21
C total (par litre). . .		7 ^{gr} ,58			12 ^{gr} ,57		1 ^{gr} ,092

Si nous passons maintenant à l'étude du phosphore, du soufre et du chlore, nous obtenons les chiffres suivants :

	EAU PEPTONÉE		PREMIÈRE MACÉRATION de viande.		BOUILLON PEPTONÉ SALÉ		
	n° I.	n° III.	n° I.	n° III.	n° I.	n° III.	n° IV.
Phosphates (en P ₂ O ₅ par litre).	0 ^{gr} ,09	0 ^{gr} ,095	0 ^{gr} ,95	1 ^{gr} ,015	1 ^{gr} ,24	1 ^{gr} ,16	0 ^{gr} ,99
Phosphates (en P par litre).	0 ^{gr} ,039	0 ^{gr} ,041	0 ^{gr} ,41	0 ^{gr} ,443	0 ^{gr} ,54	0 ^{gr} ,505	0 ^{gr} ,43
Phosphore total (en P par litre).		0 ^{gr} ,0584		0 ^{gr} ,48		0 ^{gr} ,546	
Soufre total (en S par litre).	0 ^{gr} ,041	0 ^{gr} ,0569	0 ^{gr} ,077	0 ^{gr} ,0727		0 ^{gr} ,1315	
Chlore minéral (en NaCl par litre). . .		5 ^{gr} ,55	0 ^{gr} ,82	0 ^{gr} ,70	6 ^{gr} ,61	6 ^{gr} ,14	5 ^{gr} ,90
Chlore total (en NaCl par litre).		5 ^{gr} ,55		0 ^{gr} ,70		6 ^{gr} ,14	

Le bouillon peptoné n° III a été préparé en ajoutant à la macération de viande n° III la quantité de peptone utilisée pour la préparation de l'eau peptonée n° III. Les chiffres trouvés montrent bien que le bouillon renferme la somme des éléments contenus dans chacun des constituants.

Les autres milieux fournissent les résultats suivants :

	BOUILLON LIEBIG			BOUILLON MARTIN
	n° I	n° II	n° IV	n° III
Phosphates (en P_2O_5 par litre).. .	1 gramme	0 ^{gr} , 74	0 ^{gr} , 764	0 ^{gr} , 948
Phosphates (en P par litre). . .	0 ^{gr} , 44	0 ^{gr} , 32	0 ^{gr} , 333	0 ^{gr} , 413
Phosphore total (en P par litre). . .			0 ^{gr} , 3376	0 ^{gr} , 4328
Soufre total (en S par litre). . .			0 ^{gr} , 154	0 ^{gr} , 111
Chlore minéral (en NaCl par litre). . .	8 ^{gr} , 15	7 ^{gr} , 31	6 ^{gr} , 14	7 ^{gr} , 96
Chlore total (en NaCl par litre). . .			6 ^{gr} , 14	7 ^{gr} , 99

Discussion des résultats.

De ces chiffres nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Si l'on envisage simplement les substances nutritives analysées, on constate qu'il existe peu de différence dans la constitution des différents « lots » d'un même milieu. Ainsi si nous examinons les bouillons LIEBIG, nous remarquons que ces milieux présentent tous à peu près les mêmes teneurs notamment en substances azotées. Comme nous avons noté justement sur diverses fractions de ce même bouillon, préparées à des moments différents, d'assez grosses variations dans le nombre des microbes obtenus, nous sommes conduits, dès maintenant, à penser que la grandeur de la multiplication bactérienne peut dépendre d'autres facteurs que de la teneur en matières nutritives. Ces conceptions, qui peuvent diriger les recherches vers l'étude des vitamines de croissance et de substances analogues au « bios » de WILDIERS, ont été soutenues dans ces dernières années par un certain nombre d'auteurs et en particulier par LEGROUX et MESNARD. Il est en effet probable que ces principes relativement fragiles sont plus ou moins altérés pendant la stérilisation.

Une autre explication peut également être envisagée. Les propriétés physiques de ces bouillons, qui au point de vue chimique paraissent très voisins, peuvent être légèrement différentes. Les milieux de culture, et en particulier le bouillon LIEBIG, sont fortement chargés de substances à poids moléculaire élevé. Sous l'influence des diverses manipulations, l'état semi-colloïdal de celles-ci peut être plus ou moins modifié et donner naissance à des liquides plus ou moins favorables à la nutrition bactérienne. On s'explique ainsi pourquoi divers auteurs ne stérilisent leurs milieux de culture qu'à 100 ou 105°. En effet tandis que certains échantillons de bouillon LIEBIG sont complètement limpides, d'autres restent toujours un peu opalescents. Bien plus les mêmes milieux stériles se troublent assez fréquemment lorsqu'on leur ajoute du toluène et peuvent même donner naissance à un liquide complètement opaque qui passe à travers les filtres sans modifier son aspect. Les mêmes bouillons,ensemencés puis filtrés, restent au contraire limpides après addition de cet antiseptique.

Il suffit d'ailleurs de préparer, ou de faire préparer en grand nombre

des bouillons nutritifs (comme notre fonction d'Assistant aux Travaux pratiques de Bactériologie nous y oblige) pour observer qu'il se produit pendant cette opération, qui passe cependant pour très simple, des phénomènes fort mal connus. La même macération de viande et la même peptone peuvent donner, suivant les élèves, des milieux qui restent parfaitement limpides ou qui, au contraire, finissent par présenter une floculation nette. Ces différences d'aspect, et de qualité, ne peuvent cependant pas être attribuées à des fautes de technique lourdes et visibles. L'ajustage des bouillons à un pH déterminé a fortement diminué ces irrégularités sans cependant les éliminer complètement.

2° Si nous comparons les chiffres obtenus pour les différents milieux nous pouvons faire les remarques suivantes :

a) Le bouillon LIEBIG est le milieu le plus riche en azote et en carbone total. Après lui nous trouvons le bouillon peptoné salé, puis le bouillon MARTIN. L'eau peptonée et la première macération de viande viennent ensuite avec des teneurs sensiblement égales, enfin la seconde macération de viande présente des chiffres très inférieurs.

On observe sensiblement la même progression lorsqu'on étudie les valeurs de l'azote aminé et de l'azote ammoniacal. Notons cependant que l'eau peptonée présente une teneur en azote aminé comparable à celle du bouillon MARTIN et que ce dernier possède une richesse exceptionnelle en ammoniacque résultant de son mode de préparation.

Le rapport $\frac{\text{Az titrable au formol}}{\text{Az total}}$ préconisé par M. JAVILLIER ET B.

GUÉRITHAULT (109') pour la différenciation des peptones reste toujours, à l'exception de la macération de viande préparée à 37°, compris entre 0,18 et 0,27 ; ses valeurs les plus communes s'échelonnent de 0,18 à 0,23. Rappelons que, pour ces auteurs, ce rapport est supérieur à 20 pour les peptones pancréatiques et inférieur à ce chiffre pour les peptones pepsiques.

b) La presque totalité du phosphore se trouve à l'état de phosphates dosables par l'urane. Cet élément est apporté par les macérations de viande tandis que la peptone en renferme très peu. Au point de vue de leur teneur en phosphore les milieux étudiés se rangent dans l'ordre suivant : d'abord le bouillon peptoné salé, puis la première macération de viande, le bouillon MARTIN, le bouillon LIEBIG et enfin, très loin en arrière, l'eau peptonée.

c) Les milieux étudiés renferment toujours moins de soufre que de phosphore mais il n'existe pas de rapport constant entre les quantités de ces deux éléments.

d) Tout le chlore semble être pratiquement à l'état de sel minéral. Il est assez curieux de constater que, si l'on excepte la macération de viande qui intentionnellement n'a pas été salée, tous ces milieux classiques, qui devraient cependant avoir même pression osmotique, présentent des teneurs en chlorure de sodium variant de 5^{gr},55 à 8^{gr},15 par litre.

e) Pour un milieu stérile la tension superficielle semble varier propor-

tionnellement à la quantité d'azote ammoniacal. Cet élément, sans être par lui-même la cause de ce phénomène, nous renseignerait donc dans une certaine mesure sur le degré de la protéolyse. Nous pouvons en effet grouper nos résultats dans le tableau suivant :

	BOUILLON MARTIN	BOUILLON PEPTONÉ salé.	BOUILLON LIEBIG	PREMIÈRE MACÉRATION de viande.	EAU PEPTONÉE	DEUXIÈME MACÉRATION de viande.
Nombre de gouttes données par 5 cm ³	135-137	129-130	126-127	121-122	118	117
Az ammoniacal (par litre).. . . .	0 ^{gr} ,24-0 ^{gr} ,39	0 ^{gr} ,15-0 ^{gr} ,16	0 ^{gr} ,12-0 ^{gr} ,13	0 ^{gr} ,08-0 ^{gr} ,09	0 ^{gr} ,06-0 ^{gr} ,07	0 ^{gr} ,03-0 ^{gr} ,04

MODIFICATIONS DE LA COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE SOUS L'INFLUENCE DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE.

Ces modifications peuvent être mises en évidence en comparant la composition d'un milieu stérile à la composition du même milieuensemencé, puis débarrassé des corps microbiens. Nous avons éliminé ceux-ci par filtration sur bougie CHAMBERLAND. On sépare ainsi les substances utilisées par la bactérie pour la constitution de son protoplasme et les éléments qui peuvent être adsorbés à la surface des microbes. L'analyse du filtrat nous montrera la proportion des diverses substances qui restent en solution et nous renseignera sur les modifications apportées par la multiplication microbienne à la répartition des différentes formes azotées.

La filtration sur bougie n'a pas d'influence sur la composition d'un milieu de culture.

Avant de commencer nos expériences, nous nous sommes assurés que la filtration sur bougie était sans influence sur la composition d'un milieu nutritif. Pour cela nous avons analysé, avant et après filtration sur bougie, du bouillon LIEBIG et du bouillon peptoné salé. Les résultats sont les suivants :

BOUILLON PEPTONÉ SALÉ	AVANT FILTRATION	APRÈS FILTRATION
5 cm ³ =	129,5 gouttes	129,5 gouttes
Az total.	3 ^{gr} ,63	3 ^{gr} ,66
Az amino-ammoniacal.	0 ^{gr} ,756	0 ^{gr} ,754
Az ammoniacal.	0 ^{gr} ,154	0 ^{gr} ,155
Az aminé.	0 ^{gr} ,602	0 ^{gr} ,599
Carbone total.	9 ^{gr} ,597	9 ^{gr} ,546

BOUILLON LIEBIG	AVANT FILTRATION	APRÈS FILTRATION
Az amino-ammoniacal.	0 ^{gr} , 720	0 ^{gr} , 719
Az ammoniacal.	0 ^{gr} , 091	0 ^{gr} , 094
Az aminé.	0 ^{gr} , 629	0 ^{gr} , 625
.		
5 cm ³ =	127 gouttes	127 gouttes
pH.	7,2	7,2
Phosphates (en P ₂ O ₅).	0 ^{gr} , 76	0 ^{gr} , 75
Phosphore total (en P).	0 ^{gr} , 337	0 ^{gr} , 339
Soufre total (en S).	0 ^{gr} , 154	0 ^{gr} , 137
Chlore minéral (en NaCl).	6 ^{gr} , 14	6 ^{gr} , 14
Chlore total (en NaCl).	6 ^{gr} , 14	6 ^{gr} , 14

La filtration à la bougie ne modifie donc pas d'une manière appréciable la composition d'un milieu stérile dont le pH est au voisinage de la neutralité.

Séparation des germes microbiens.

Nous avons opéré avec des matras de 1 litre renfermant 400 centimètres cubes du milieu à étudier. Celui-ci était ensemencé à raison de 500 000 germes « visibles » par centimètre cube. Aussitôt après l'ensemencement on procédait à la numération des germes capables de se reproduire sur gélose et on plaçait le ballon à l'étuve à 37°. Pendant son séjour à l'étuve le matras était fréquemment agité et débouché pour permettre le renouvellement de l'air, on contrôlait en même temps à l'aide de quelques prélèvements la multiplication des bacilles capables de se reproduire sur plaque de gélose. Le nombre de ceux-ci était encore déterminé au moment de la filtration sur bougie. Comme nous l'avons déjà dit, les chiffres ainsi obtenus ne sont pas aussi précis que ceux que nous avons utilisés pour établir nos courbes, ils permettent cependant de se rendre compte si la multiplication microbienne a été normale ou non.

Nous avons éliminé les corps microbiens, par filtration à la bougie, à la 48^e heure de la culture. Cette période correspond à peu près au maximum des germes « vivants ». En attendant plus longtemps on observe sans doute des variations plus grandes dans la composition des liquides nutritifs mais la lyse des bactéries peut alors se produire et venir fausser les résultats. Ce que nous doserons dans un filtrat trop âgé ne sera pas constitué seulement par les substances laissées de côté par les microbes, mais on y rencontrera aussi des éléments, d'abord assimilés par les bactéries, puis restitués par elles au liquide au moment de leur destruction. Ce n'est donc que dans de rares cas que nous avons filtré nos milieux au 9^e jour de la culture.

Avant de filtrer sur bougie une culture microbienne, on commence par la passer une ou plusieurs fois sur un filtre en papier. On sépare ainsi la majeure partie des corps microbiens qui provoqueraient très rapidement le

colmatage de la bougie poreuse. La filtration est ensuite conduite assez lentement et en évitant de produire une dépression trop accentuée. Le métabolisme microbien a en effet donné naissance à des composés volatils : gaz carbonique, ammoniacque et peut-être azote qu'il importe de maintenir dans le milieu. La formation d'azote résulterait, d'après les travaux de GRIMBERT (90), de l'attaque des nitrates et des nitrites ; les analyses de viande ou de jus de viande ne laissent pas prévoir qu'il existe beaucoup de ces derniers corps dans le bouillon. Nos milieux étant alcalins au moment de la filtration, le gaz carbonique qu'ils renferment doit s'y trouver fixé à l'état de carbonates alcalins. En effectuant des opérations analogues sur des cultures de bacille diphtérique, ABT et LOISEAU (2) indiquent que la filtration à la bougie, avec le minimum de succion, ne fait pas varier sensiblement la concentration du gaz carbonique dissous. Nous avons vérifié de notre côté qu'on obtenait les mêmes valeurs pour l'azote ammoniacal en pratiquant le dosage sur la culture simplement filtrée au papier, ou sur la même culture filtrée sur bougie. Nous avons trouvé par exemple les chiffres suivants :

AZ AMMONIACAL PAR LITRE.

<i>Eau peptonée</i> : filtrée au papier. . . .	0 ^{gr} , 271	filtrée sur bougie. . . .	0 ^{gr} , 28
<i>Eau peptonée salée</i> : filtrée au papier. . .	0 ^{gr} , 305	filtrée sur bougie. . . .	0 ^{gr} , 31
<i>Macération de viande</i> : filtrée au papier.	0 ^{gr} , 46	filtrée sur bougie. . . .	0 ^{gr} , 44

Nous avons divisé nos recherches en deux parties. Une première série d'expériences nous a permis d'étudier le métabolisme du carbone et de l'azote. Dans une deuxième série nous avons dosé le phosphore, le soufre et le chlore. Il est en effet parfois assez difficile, par suite du colmatage des bougies ou des filtres, de filtrer la totalité d'un milieuensemencé. On risque alors de ne pas disposer d'une quantité suffisante de liquide pour effectuer tous les dosages. D'autre part nous avions intérêt à faire ceux-ci rapidement. On évitait ainsi des précipitations possibles et on n'avait pas à craindre des dédoublements ultérieurs sous l'action des diastases qui peuvent continuer à agir malgré l'addition d'un antiseptique. Nous avons toujours mesuré la tension superficielle et procédé au dosage du carbone sur le liquide récemment filtré et ne renfermant aucune substance étrangère. Quand les autres dosages ne pouvaient pas être mis en train le jour même, nous ajoutions au liquide un peu de toluène pour assurer sa conservation.

Comparaison entre la multiplication du bacille pyocyanique dans l'eau peptonée simple et dans l'eau peptonée salée.

L'étude bactériologique de la multiplication du bacille pyocyanique nous a montré que l'addition classique de 5 grammes de chlorure de sodium à chaque litre d'eau peptonée était sans influence sur le développement de cette bactérie. Nous allons faire la même constatation en examinant le métabolisme de ce bacille.

Nous avons ensemencé, à la fois, avec la même émulsion microbienne de l'eau peptonée simple et de l'eau peptonée salée et nous avons effectué des dosages au bout de 48 heures et après 9 jours de culture. L'eau peptonée salée avait été obtenue en ajoutant, avant la stérilisation, 5 pour 1 000 de chlorure de sodium à une fraction de l'eau peptonée simple. Les résultats sont réunis dans le tableau suivant :

	EAU PEPTONÉE stérile	CULTURES DE 48 HEURES		CULTURES DE 9 JOURS	
		EAU PEPTONÉE simple	EAU PEPTONÉE salée	EAU PEPTONÉE simple	EAU PEPTONÉE salée
Nombre de bacilles « vivants » par centimètre cube au moment de la filtration.	0	3300000000	3466000000	160000000	86000000
Tension superficielle 5 centimètres cubes. . =	118,5 goutt s	106,5 gouttes	107 gouttes	108,5 gouttes	107,5 gouttes
pH.	7,1	8,1	8,0	8,9	8,6
Déviati on polarimétrique (l = 1).	— 34' p	— 22' p	— 20' p	— 10'	— 10'
Az total (par litre). . .	1 ^{gr} ,48	1 ^{gr} ,18	1 ^{gr} ,23	1 ^{gr} ,12	1 ^{gr} ,15
Az amino-ammoniacal (par litre).	0 ^{gr} ,37	0 ^{gr} ,42	0 ^{gr} ,44	0 ^{gr} ,71	0 ^{gr} ,71
Az ammoniacal (par litre). .	0 ^{gr} ,07	0 ^{gr} ,28	0 ^{gr} ,31	0 ^{gr} ,71	0 ^{gr} ,71
Az aminé (par litre).. .	0 ^{gr} ,30	0 ^{gr} ,14	0 ^{gr} ,13	0	0
Acide urique (Grigaut) (par litre).	0 ^{gr} ,019	0 ^{gr} ,015	0 ^{gr} ,016	0 ^{gr} ,013	0 ^{gr} ,014
Chlore minéral (en NaCl par litre).	0 ^{gr} ,41	0 ^{gr} ,41	5 ^{gr} ,26	0 ^{gr} ,46	5 ^{gr} ,21

L'examen de tous ces chiffres nous montre qu'il n'existe aucune différence entre ces deux cultures. L'addition d'une quantité importante de chlorure de sodium est donc sans influence sur la multiplication du bacille pyocyanique. Nous avons là une nouvelle confirmation de la constatation faite par I. S. FALK (64). Cet auteur fait remarquer qu'il n'y a probablement que très peu de groupes de formes animales ou végétales dont l'indifférence physiologique à l'égard de changements marqués de la pression osmotique égale celle des bactéries. Il ajoute en outre que nous ne connaissons pas la pression osmotique du protoplasme microbien, et que l'usage courant d'utiliser, pour la préparation de n'importe quel milieu, une solution « physiologique » de chlorure de sodium, ne repose sur aucune base solide. Il n'y a aucune raison pour supposer que cette solution, empruntée à la physiologie des vertébrés, soit « isotonique » avec le protoplasme bactérien.

Les chlorures entrant dans la composition des bactéries s'y trouvent d'ailleurs dans un état particulier. M. GUILLEMIN et N. P. LARSON (92)

divisent les sels contenus dans le protoplasme microbien en deux groupes :

1° *les sels libres* qui diffusent au dehors des bactéries tuées, qui paraissent jouer un rôle purement physique (maintien de la pression osmotique par exemple), et dont la proportion doit varier avec la composition du milieu extérieur ;

2° *les sels fixes* ou sels de structure qui ne diffusent pas en dehors de l'organisme et qui devraient être relativement constants pour une espèce microbienne donnée.

Ces auteurs utilisent dans leurs expériences une culture de 48 heures de colibacille en bouillon peptoné salé. Les bacilles, séparés par centrifugation et lavés une première fois à l'eau distillée, sont mis en suspension dans l'eau distillée et tués par un chauffage de 30 minutes à 60°. La suspension est alors refroidie, diluée à nouveau avec de l'eau distillée et laissée au repos pendant quelques heures pour permettre la diffusion des sels. On sépare à nouveau les bacilles par centrifugation et on détermine, après calcination, d'une part les sels qui restent dans les cendres des bactéries (sels fixes) et d'autre part les sels qui sont passés en solution (sels libres). On constate alors que 57,2 pour 100 des sels ont diffusé hors des organismes. Tous les éléments minéraux sont représentés dans les deux groupes de sels sauf deux exceptions. Le fer se retrouve presque entièrement dans les sels fixes tandis que le chlore a passé tout entier dans les sels libres. Les auteurs en concluent que les chlorures ne sont pas indispensables à la structure de la cellule, mais qu'ils servent seulement à équilibrer la pression des chlorures du milieu extérieur ou à une autre fonction inconnue. Remarquons d'ailleurs que dans leurs expériences le chlore ne constitue que 7 pour 100 des sels libres. Les sulfates existent également en bien plus grande quantité dans les sels libres que dans les sels fixes, quant aux phosphates on les rencontre en quantités importantes dans ces deux groupes de composés.

A ce propos nous devons signaler que E. POZERSKI (155), en étudiant l'excrétion des composés phosphorés par différents microbes, a trouvé que tous les germes examinés (bacille de Shiga, *Proteus vulgaris*, bacille de Flexner, bacille typhique, colibacille, staphylocoque, etc.), mis en suspension dans l'eau, possèdent la propriété d'excréter des composés phosphorés tant qu'ils sont vivants, mais que ce phénomène cesse avec la mort des bactéries, que cette mort soit provoquée par le vieillissement, la chaleur ou les antiseptiques. Ces résultats paraissent donc en contradiction avec ceux de M. GUILLEMIN et P. LARSON. Remarquons cependant que POZERSKI stérilise ses cultures par un chauffage de 10 minutes à 100° tandis que les auteurs précédents ne dépassent pas pour cela 60°. En outre POZERSKI (154) constate que tandis que le formol ajouté à haute dose (1/400) à une émulsion microbienne arrête à la fois, chez les bactéries, l'excrétion des composés phosphorés et la propriété de se reproduire, le même antiseptique, agissant à faible dose (1/4000), fait cesser rapidement le pouvoir reproducteur mais laisse subsister l'élimination des composés phos-

phorés. Ce dernier phénomène est lui-même très rapidement interrompu lorsqu'on additionne la suspension microbienne d'une forte dose de formol. L'excrétion des composés phosphorés dépendrait donc, en quelque sorte, de l'état dans lequel se trouve le protoplasme ou la membrane bactérienne.

Influence de la multiplication du bacille pyocyanique sur la composition des milieux de culture.

Les tableaux suivants groupent une série de dosages effectués, d'une part sur les milieux stériles, et d'autre part sur les mêmes milieuxensemencés et filtrés après 48 heures de culture.

Le premier tableau résume les variations de la tension superficielle, du pH et de la déviation polarimétrique lorsqu'il a été possible de la mesurer.

	NOMBRE DE BACILLES « vivants » au moment de la filtration	TENSION SUPERFICIELLE 5 centimètres cubes =		pH		DÉVIATION POLARIMÉTRIQUE (l = 1)	
		au départ	après culture	au départ	après culture	au départ	après culture
		gouttes	gouttes				
Eau peptonée sa- lée.	I	3 563 000 000	118,5	7,2	8,2	— 27'	»
	II	3 130 000 000	114	7,2	8,2	— 25'	»
Première macéra- tion de viande.	I	3 500 000 000	122,5	6,9	8,4	— 5'	— 5'
	II	3 000 000 000	119,5	7,0	8,2	— 5'	»
Bouillon peptoné salé.	I	3 600 000 000	129,5	7,0	8,4	— 30'	»
	II	4 700 000 000	126,5	7,1	8,3	»	»
Bouillon Liebig. .	I	4 560 000 000	127	7,0	> 8,4	»	»
	II	2 800 000 000	127	7,2	8,0	»	»
Bouillon Martin. .	I	3 766 000 000	137	7,1	8,2	— 1° 2'	— 57'
	II	4 560 000 000	136,5	7,0	8,2	— 1"	— 44'
Deuxième macération de viande.		2 506 000 000		7,0	> 8,4		— 7'

Le second tableau est réservé pour les composés azotés et pour le carbone total. Nous y indiquons également la valeur du rapport $\frac{\text{carbone total}}{\text{azote total}}$ pour les milieux stériles, les milieux ensemencés et filtrés et pour les quantités éliminées par filtration.

Enfin dans le troisième tableau nous indiquons les valeurs trouvées pour le soufre total, le chlore (chlore minéral et chlore total) et le phosphore. Pour ce dernier élément nous avons donné les chiffres trouvés pour le phosphore total par la méthode de H. COPAUX et les chiffres obtenus par le dosage à l'urane et qui, par conséquent, correspondent aux phosphates minéraux. Le phosphore total, enlevé au milieu ensemencé par filtration à la bougie, étant toujours supérieur au phosphore

	EAU PEPTONÉE SAUÉE	PREMIÈRE MACÉRATION DE VIANDE	BOUILLON PEPTONÉ SAUÉ	BOUILLON LIEBIG	BOUILLON MARTIN	DEUXIÈME MACÉRATION DE VIANDE
Bacilles « vivants » au moment de la filtration.	3 563 000 000	3 500 000 000	3 600 000 000	4 560 000 000	3 766 000 000	2 506 000 000
Az total { au départ. (après culture.	1 ^{er} , 516 1 ^{er} , 302	1 ^{er} , 73 1 ^{er} , 452	3 ^{er} , 628 3 ^{er} , 290	4 ^{er} , 083 3 ^{er} , 871	3 ^{er} , 05 2 ^{er} , 82	0 ^{er} , 494 0 ^{er} , 385
Az total disparu.	0 ^{er} , 214	0 ^{er} , 278	0 ^{er} , 338	0 ^{er} , 212	0 ^{er} , 23	0 ^{er} , 109
Az amino-ammoniacal { au départ. (après culture.	0 ^{er} , 36 0 ^{er} , 466	0 ^{er} , 326 0 ^{er} , 283	0 ^{er} , 756 0 ^{er} , 756	0 ^{er} , 852 1 ^{er} , 074	0 ^{er} , 581 0 ^{er} , 558	0 ^{er} , 107 0 ^{er} , 122
Az amino-ammoniacal { disparu. (formé.	0 ^{er} , 043 0 ^{er} , 106	0 ^{er} , 043 0 ^{er} , 106	0 0	0 ^{er} , 033 0 ^{er} , 222	0 ^{er} , 033 0 ^{er} , 222	0 ^{er} , 015
Az ammoniacal { au départ. (après culture.	0 ^{er} , 06 0 ^{er} , 329	0 ^{er} , 084 0 ^{er} , 136	0 ^{er} , 154 0 ^{er} , 303	0 ^{er} , 12 0 ^{er} , 511	0 ^{er} , 246 0 ^{er} , 343	0 ^{er} , 029 0 ^{er} , 083
Az ammoniacal formé.	0 ^{er} , 269	0 ^{er} , 052	0 ^{er} , 149	0 ^{er} , 391	0 ^{er} , 097	0 ^{er} , 054
Az aminé { au départ. (après culture.	0 ^{er} , 30 0 ^{er} , 137	0 ^{er} , 242 0 ^{er} , 147	0 ^{er} , 602 0 ^{er} , 453	0 ^{er} , 732 0 ^{er} , 563	0 ^{er} , 335 0 ^{er} , 215	0 ^{er} , 078 0 ^{er} , 039
Az aminé disparu.	0 ^{er} , 163	0 ^{er} , 095	0 ^{er} , 149	0 ^{er} , 169	0 ^{er} , 12	0 ^{er} , 039
C total { au départ. (après culture.	4 ^{er} , 30 4 ^{er} , 06	4 ^{er} , 655 4 ^{er} , 169	9 ^{er} , 597 8 ^{er} , 817	12 ^{er} , 57 11 ^{er} , 665	7 ^{er} , 58 6 ^{er} , 05	1 ^{er} , 092 0 ^{er} , 766
C disparu.	0 ^{er} , 24	0 ^{er} , 186	0 ^{er} , 78	0 ^{er} , 905	0 ^{er} , 63	0 ^{er} , 326
Rapport $\frac{C}{Az}$ dans le milieu stérile.	2, 836	2, 69	2, 644	3, 08	2, 485	2, 21
Rapport $\frac{C}{Az}$ dans la culture filtrée.	3, 123	2, 87	2, 679	3, 01	2, 463	1, 989
Rapport $\frac{C\text{ disparu}}{Az\text{ disparu}}$	1, 121	1, 74	2, 3	4, 25	2, 75	3

	EAU PEPTONÉE		PREMIÈRE MACÉRATION DE VIARDE	BOUILLON PEPTONÉ SALE	BOUILLON LIEBIG	BOUILLON MARTIN
	SALÉE.					
Bacilles « vivants » au moment de la filtration.		3 130 000 000	3 000 000 000	4 700 000 000	2 800 000 000	4 560 000 000
S total (en S) { au départ.	0 ^{gr} ,0569		0 ^{gr} ,0727	0 ^{gr} ,1315	0 ^{gr} ,154	0 ^{gr} ,111
S disparu.	0 ^{gr} ,0545		0 ^{gr} ,0702	0 ^{gr} ,1144	0 ^{gr} ,119	0 ^{gr} ,113
	0 ^{gr} ,0024		0 ^{gr} ,0025	0 ^{gr} ,0171	0 ^{gr} ,035	0
Cl minéral (en NaCl) { au départ.	5 ^{gr} ,55		0 ^{gr} ,70	6 ^{gr} ,14	6 ^{gr} ,14	7 ^{gr} ,96
Cl disparu.	5 ^{gr} ,55		0 ^{gr} ,70	6 ^{gr} ,09	6 ^{gr} ,14	7 ^{gr} ,99
	0		0	0 ^{gr} ,05	0	0
Cl total (en NaCl) { au départ.	5 ^{gr} ,55		0 ^{gr} ,70	6 ^{gr} ,14	6 ^{gr} ,14	7 ^{gr} ,99
Cl disparu.	5 ^{gr} ,55		0 ^{gr} ,70	6 ^{gr} ,11	6 ^{gr} ,12	8 ^{gr} ,08
	0		0	0 ^{gr} ,03	0 ^{gr} ,02	0
Phosphates (en P) { au départ.	0 ^{gr} ,041		0 ^{gr} ,443	0 ^{gr} ,505	0 ^{gr} ,333	0 ^{gr} ,413
Phosphates disparus (en P).	0 ^{gr} ,034		0 ^{gr} ,382	0 ^{gr} ,401	0 ^{gr} ,265	0 ^{gr} ,399
	0 ^{gr} ,007 ?		0 ^{gr} ,061	0 ^{gr} ,014	0 ^{gr} ,068	0 ^{gr} ,014
Phosphore total (en P) { au départ.	0 ^{gr} ,0584		0 ^{gr} ,480	0 ^{gr} ,546	0 ^{gr} ,3376	0 ^{gr} ,4328
Phosphore total disparu (en P).	0 ^{gr} ,0268		0 ^{gr} ,406	0 ^{gr} ,501	0 ^{gr} ,2658	0 ^{gr} ,403
	0 ^{gr} ,0316		0 ^{gr} ,074	0 ^{gr} ,045	0 ^{gr} ,0718	0 ^{gr} ,0298
Différence entre le phosphore total disparu et le phosphore des phosphates enlevé au milieu.	0 ^{gr} ,0246		0 ^{gr} ,013	0 ^{gr} ,031	0 ^{gr} ,0038	0 ^{gr} ,0158

titrable à l'urane, disparu dans les mêmes conditions, nous avons calculé les différences existant entre ces deux quantités.

Les résultats sont donnés en grammes par litre. Pour chaque ensemencement nous indiquons le nombre des bacilles capables de se reproduire sur gélose qui existaient dans les cultures au moment de la filtration.

A ces résultats nous pouvons joindre les chiffres suivants qui se rapportent à des cultures filtrées le 9^e jour après l'ensemencement.

	PREMIÈRE MACÉRATION DE VIANDE		BOUILLON PEPTONÉ SALÉ	
	au départ	après 9 jours	au départ	après 9 jours
Tension superficielle 5 cm ³ . =	121 gouttes	106 gouttes	130,5 gouttes	111 gouttes
pH.	7,0	8,5	6,8	8,4
Az total.	1 ^{er} ,34	1 ^{er} ,29	3 ^{er} ,19	2 ^{er} ,86
Az amino-ammoniacal.	0 ^{er} ,27	0 ^{er} ,44	0 ^{er} ,71	1 ^{er} ,10
Az ammoniacal.	0 ^{er} 09	0 ^{er} ,44	0 ^{er} ,16	0 ^{er} ,96
Az aminé.	0 ^{er} ,18	0	0 ^{er} ,55	0 ^{er} ,14
Chlore minéral (en NaCl).	0 ^{er} ,82	0 ^{er} ,82	6 ^{er} ,61	6 ^{er} ,66

De toutes ces expériences nous pouvons essayer de tirer des conclusions relatives aux changements apportés à la composition des milieux de culture par la multiplication microbienne, à la constitution des bactéries, aux causes d'arrêt du développement microbien et enfin à la valeur nutritive des milieux utilisés.

1^o CHANGEMENTS APPORTÉS A LA COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE. —

Nous examinerons successivement les variations de la tension superficielle, du pH, de la déviation polarimétrique et des principaux éléments dosés au cours de nos essais.

a) *Tension superficielle.* — La tension superficielle augmente sous l'influence de la nutrition bactérienne. Le nombre des gouttes données par 5 centimètres cubes de liquide diminue rapidement pendant les deux premiers jours de la culture, puis semble se maintenir à peu près stationnaire, si l'on considère les expériences faites en eau peptonée et en eau peptonée salée. Ce phénomène est probablement lié à la désintégration des peptones.

b) *pH.* — Les cultures s'alcalinisent très rapidement sans que les variations observées soient proportionnelles à la quantité d'ammoniaque produite. Les facteurs qui déterminent les modifications du pH des cultures microbiennes sont d'ailleurs multiples, comme l'ont indiqué ABT et LOISEAU (2).

c) *Déviation polarimétrique.* — Par suite de la coloration des liquides, la mesure de la déviation polarimétrique n'a été possible que dans un petit nombre de cas. Nous avons alors constaté une légère diminution du pouvoir rotatoire. Cette observation peut être rapprochée du fait que les

peptones pancréatiques ont constamment un pouvoir rotatoire moins élevé que les peptones pepsiques.

d) *Composés azotés*. — Le bacille pyocyanique est un bacille protéolytique capable d'attaquer les substances albuminoïdes complexes et de les décomposer jusqu'au stade ammoniacal. Nos milieux étant privés de glucides, le bacille empruntera le carbone nécessaire à la constitution de son protoplasme et à ses besoins énergétiques aux peptones. Cependant, comme le microbe a besoin de plus de carbone que d'azote, il sera amené à détruire une grande quantité de matière organique et à laisser, comme résidu, de l'ammoniaque :

Nos essais nous montrent que dans un milieu ensemencé :

l'azote total, dont une fraction est utilisée pour la constitution du protoplasme bactérien, diminue nettement ;

l'azote aminé décroît également et peut même disparaître complètement au bout de 9 jours de culture (eau peptonée simple, eau peptonée salée, première macération de viande) ;

l'azote ammoniacal augmente sans cesse et peut atteindre, au 9^e jour de la culture, des chiffres dix fois plus grands qu'au départ.

Ces variations de l'azote aminé et surtout de l'azote ammoniacal dans les cultures de bacille pyocyanique ont déjà été étudiées par différents auteurs.

Dès 1891, ARNAUD et CHARRIN (4), (5), en étudiant la multiplication du bacille pyocyanique dans un milieu synthétique renfermant comme source d'azote de l'asparagine, constatèrent que la proportion d'azote ammoniacal, nulle au début, augmente très rapidement pendant les trois premiers jours de la culture puis croît ensuite beaucoup plus lentement jusqu'au 15^e jour. Inversement l'asparagine diminue très rapidement et, dès la 60^e heure, il est impossible d'en déceler la présence. Enfin l'acide aspartique, qui avait commencé à se former dès le début de la culture, disparaît lui-même vers la 72^e heure. En remplaçant l'asparagine par la gélatine, ces auteurs observèrent également la formation d'une quantité importante d'ammoniaque mais cette production, moins rapide au début de la culture, se poursuivait à peu près régulièrement pendant les 10 premiers jours. Elle devenait ensuite moins importante et s'annulait pratiquement à partir du 16^e jour.

E. AUBEL (6) a repris l'étude de la dégradation de l'asparagine en dosant l'azote amino-ammoniacal par la méthode de SOERENSEN et l'azote ammoniacal par la méthode de FOLIN. En comparant les chiffres ainsi obtenus on constate que l'azote aminé a complètement disparu au bout de 48 heures, que l'azote ammoniacal augmente très rapidement pendant les 2 premiers jours mais qu'il est moins abondant le 8^e jour que le second.

Ces résultats, et les nôtres, paraissent différents de ceux que l'on obtient lorsqu'on s'adresse au bacille de KOCH. En étudiant le métabolisme du bacille tuberculeux humain A, P. COURMONT, A. MOREL et I. BAY (44) (45) remarquèrent que, dans un milieu défini à base de sulfate d'ammo-

nium, l'azote ammoniacal diminuait pendant les 2 ou 3 premiers mois. Quand au contraire on utilisait du bouillon peptoné glycérimé l'azote ammoniacal et l'azote aminé diminuaient au cours de la 2^e semaine, puis augmentaient par la suite. Il semble d'ailleurs que, dans ce dernier cas, les déterminations ont été faites dans des cultures non filtrées.

Si nous examinons plus particulièrement les chiffres trouvés dans nos expériences pour l'eau peptonée simple et pour l'eau peptonée salée, nous pouvons faire une constatation fort importante.

Prenons, par exemple, l'eau peptonée simple : entre le temps 0 et la 48^e heure l'azote total disparu, et qui évidemment a été utilisé pour la constitution du protoplasme bactérien, est égal à 0^{gr},30. Entre la 48^e heure et le 9^e jour, au contraire, l'azote total ne diminue que de 0^{gr},06. Ces chiffres nous montrent donc que la multiplication microbienne s'arrête pratiquement dès la 48^e heure et c'est ce que nous avons également constaté, au chapitre précédent, en procédant à l'étude numérique de la croissance microbienne.

Si nous considérons, au contraire, l'azote ammoniacal et l'azote aminé nous observons que la formation d'azote ammoniacal s'est continuée très active après la 48^e heure (0^{gr},07 au départ, 0^{gr},28 à la 48^e heure, 0^{gr},71 au 9^e jour), et que la disparition de l'azote aminé s'est poursuivie de la même façon (0^{gr},30 au départ, 0^{gr},14 à la 48^e heure, 0^{gr},00 au bout du 9^e jour).

Nous sommes obligés d'admettre que le métabolisme n'a pas pris fin avec l'arrêt de la multiplication, mais qu'il s'est même continué activement malgré la mort des bactéries. Nous voyons donc que :

1^o Quand les bactéries ne se multiplient plus, elles peuvent pourtant exercer leur chimisme.

2^o Quand les bactéries (ferments figurés) se détruisent, les ferments solubles, mis en liberté, continuent leur action.

Ces observations, déjà anciennes mais qu'il n'est pas inutile de remettre en évidence, nous montrent donc que les modifications chimiques ne sont pas forcément parallèles au développement microbien, et qu'il est fort possible que certains résultats, obtenus par des mesures chimiques, ne soient plus valables lorsqu'on les applique à l'évolution de la multiplication microbienne elle-même.

e) *Carbone*. — Le carbone total diminue nettement sans qu'il soit possible de trouver une relation bien nette entre l'importance de cette diminution et la richesse en carbone du milieu initial. Dans tous nos milieux stériles le rapport $\frac{\text{Carbone total}}{\text{Azote total}}$ est compris entre 2,2 et 3, la quantité de carbone disparu est toujours plus grande que la quantité d'azote fixé par les bacilles et le rapport $\frac{\text{Carbone total}}{\text{Azote total}}$ dans le milieu cultivé et filtré reste compris entre 2 et 3. Dans de nouvelles expériences nous chercherons à évaluer la quantité de CO² formé.

f) *Soufre*. — La fixation du soufre paraît assez faible et irrégulière.

g) *Chlore*. — Les méthodes employées ne nous ont pas permis de constater une diminution de la teneur en chlore des milieux ensemencés. Les quantités de cet élément qui pourraient être utilisées par les bacilles sont donc très faibles, et le rôle joué par le chlorure de sodium ajouté à nos milieux de culture est, dans le cas qui nous occupe, tout à fait secondaire ce qui confirme les expériences de M. GUILLEMIN et N. P. LARSON (92). Ceci était d'ailleurs facile à prévoir car les milieux synthétiques de LIOT et de AUBEL ne renferment pas cet élément.

h) *Phosphore*. — Le phosphore disparu des milieux de culture n'appartient pas entièrement au phosphore titrable par l'urane. Les diminutions observées sont toujours nettes et peuvent atteindre dans le cas de milieux pauvres en phosphore (eau peptonée par exemple) la moitié de la quantité mise en œuvre.

ABT et LOISEAU (2), en dosant l'acide phosphorique à l'état de pyrophosphate de magnésium, avaient déjà trouvé que le bouillon MARTIN renfermait, par litre, environ 1^{er},82 de phosphate disodique soit, sensiblement, 0^{er},397 de phosphore. Des bacilles diphtériques cultivés dans ce milieu fixaient 4,83 pour 100 du phosphore originel c'est-à-dire 0^{er},019. Ces chiffres sont du même ordre que ceux que nous obtenons pour nos essais en bouillon MARTIN.

En résumé nous voyons que la multiplication du bacille pyocyanique provoque surtout une augmentation de la tension superficielle, une alcalinisation rapide du milieu et une diminution nette de la teneur en azote total, en carbone et en phosphore. L'azote ammoniacal augmente et l'azote aminé tend vers zéro. Enfin tandis que la fixation du soufre paraît assez faible, celle du chlore semble tout à fait négligeable.

FRIEDLEIN (69) en cultivant le bacille para-typhique B, le colibacille et le bacille pyocyanique dans des milieux chimiquement définis a obtenu des résultats analogues. Pour cet auteur, les combinaisons carbonées, azotées et phosphorées sont indispensables à la multiplication de ces bactéries. Le magnésium et le soufre, qui accélèrent la croissance des germes, ne sont pas indispensables à la vie des microbes. Enfin chacun des trois ions K, Na, Cl peut manquer isolément dans le milieu de culture, sans qu'il en résulte un dommage pour la bactérie.

2° CONSTITUTION DES BACTÉRIES. — Les chiffres exprimant les modifications des divers éléments sous l'influence de la multiplication microbienne sont assez différents les uns des autres. Pour essayer de les rendre comparables, nous pouvons tenir compte du nombre des germes produits par les différents milieux, et réunir dans un tableau les modifications provoquées par la formation de un milliard de germes « vivants ». Tandis que les analyses des corps microbiens ont été faites sur des masses bactériennes isolées par centrifugation ou raclage (masses renfermant souvent un mélange d'individus d'âges très divers parmi lesquels un certain nom-

bre peuvent déjà être plus ou moins autolysés), nos expériences, faites dans les mêmes conditions et portant sur des bacilles jeunes, devraient nous fournir des chiffres concordants. Le tableau suivant nous montre qu'il n'en est rien :

MODIFICATIONS PRODUITES PAR 1 MILLIARD DE GERMES	EAU PEPTONÉ salé	PREMIÈRE MACÉRATION de viande.	BOUILLON PEPTONÉ salé.	BOUILLON LIEBIG	BOUILLON MARTIN	DEUXIÈME MACÉRATION de viande..	VARIATIONS OBSERVÉES
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	
Az total disparu.. . . .	0,061	0,079	0,094	0,047	0,062	0,043	1 à 2,18
Az ammoniacal formé . . .	0,076	0,014	0,041	0,087	0,026	0,021	1 à 6,2
Az aminé disparu.	0,046	0,027	0,041	0,037	0,032	0,015	1 à 3
C total disparu.	0,068	0,138	0,216	0,201	0,170	0,130	1 à 3,17
P total disparu.	0,010	0,024	0,009	0,025	0,006		1 à 4,16

Les chiffres ainsi obtenus ne possèdent pas une valeur absolue. On pourrait, par exemple, penser à un début de précipitation des phosphates dans divers milieux, précipitation provoquée par l'alcalinisation des cultures. Cependant tous nos milieux, au moment de la filtration, présentent sensiblement le même pH. Bien plus, ce n'est pas dans les liquides les plus alcalins, que la diminution de la teneur en phosphore est la plus grande. C'est ainsi que le bouillon peptoné salé, avec un pH de 8,3, n'a perdu que 0^{gr},009 de phosphore, tandis que le bouillon LIEBIG, avec un pH de 8,0, en a perdu 0^{gr},025. Nous sommes donc amenés à penser que les grosses différences observées, et en particulier les variations dans la teneur en azote total, ne peuvent s'expliquer que par des changements dans la composition des bactéries.

Il est en effet universellement admis que la composition chimique des bactéries varie non seulement avec l'âge de la culture mais encore, et surtout, avec les caractéristiques chimiques et physiques des milieux ensemencés. Les différences ainsi observées peuvent être considérables. C'est ainsi que CRAMER (49) a trouvé que la proportion de cendres du vibron cholérique variait de 8 à 28 pour 100 suivant la composition du liquide de culture. La constitution des cendres se modifiait en même temps et leur teneur en P²O⁵ passait de 9,6 à 45 pour 100. Dans l'ouvrage de BUCHANAN et FULMER (29) on trouve que la proportion des cendres du bacille tuberculeux varie de 1,7 à 9,5 pour 100 suivant les auteurs. Récemment A. FROUIN et M. GUILLAUMIE (71) ont montré que la teneur en cendres du bacille tuberculeux dépendait de la race utilisée, de la nature du milieu de culture, de la concentration minérale des milieux chimiquement définis et de l'âge de la culture. Le bacille humain (race Test de l'Institut Pasteur), qui renferme 2,83 pour 100 de cendres lorsqu'on le cultive en bouillon peptoné glycérimé, n'en renferme plus que 1,57 pour 100 lorsqu'il s'est développé en milieu synthétique.

Ces quelques remarques nous montrent bien toute l'importance que présente la question de l'unification des liquides de culture et de la préparation de bons milieux chimiquement définis. C'est en effet seulement quand les liquides de culture sont identiques comme composition, que les caractères culturels de deux organismes peuvent être comparés, ou que les résultats des études faites par différents expérimentateurs peuvent être confrontés.

Cependant si les différences observées dans la fixation des différents éléments par le bacille pyocyanique sont nettes, il est impossible de les expliquer en faisant intervenir la composition du milieu initial. L'azote disparu n'est pas proportionnel à la quantité d'azote contenu dans le milieu stérile et il en est de même pour le carbone et pour le phosphore.

3° RELATION ENTRE L'INTENSITÉ DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE ET LA COMPOSITION DU MILIEU NUTRITIF. — L'étude bactériologique, faite au chapitre précédent, nous a déjà montré que si le maximum des germes capables de se reproduire sur gélose paraît être en relation avec la composition du milieu nutritif, la valeur de ce maximum est loin d'être proportionnelle à la richesse du liquide de culture.

L'analyse chimique nous fournit maintenant les mêmes résultats. La deuxième macération de viande ne renferme que 0^{gr},49 d'azote total et 1^{gr},09 de carbone par litre, elle donne cependant un maximum de germes capables de se multiplier sur gélose égal, en moyenne, à 2 600 000 000 par centimètre cube, tandis que le bouillon LIEBIG, avec ses 4 grammes d'azote et ses 12^{gr},60 de carbone n'atteint guère que 4 900 000 000.

Bien mieux, cet excès de substances nutritives semble même défavorable à la biologie des bactéries, puisque le nombre des germes « vivants » après 9 jours de séjour à 37° est plus petit pour le bouillon LIEBIG que pour tous les autres milieux.

Nous retrouvons là des résultats analogues à ceux déjà obtenus par différents auteurs. C'est ainsi que S. SIERAKOWSKI, Z. MODRZEWSKA, H. RABINOWICZ et E. SALAMON (177) en cultivant différents germes sur milieux gélosés et en évaluant, par la méthode néphélométrique, le nombre des bactéries recueillies par raclage de la surface, ont observé les faits suivants :

Le nombre des microbes fournis par un centimètre cube de milieu dilué est à peu près inversement proportionnel à la dilution. Dans les milieux contenant 1 à 2,5 pour 100 de peptone et une dilution d'extrait de viande à la concentration de 0,5 à 1,25 pour 100, le nombre des microbes n'est plus proportionnel à la concentration des matières nutritives. Cependant l'importance de la récolte est encore en relation avec la richesse du milieu. Enfin quand la concentration du milieu augmente encore, le développement des germes n'est pas plus intense et on observe, au contraire, une certaine diminution, excepté lorsqu'il s'agit de bacilles dysentériques.

En ensemençant des bacilles tuberculeux dans un liquide sucré, glycé-
riné et minéralisé, additionné de quantités croissantes d'un liquide de
digestion pancréatico-intestinale et en pesant les bacilles récoltés au
15^e jour de la culture, L. BOEZ (23) obtient les résultats suivants qui
montrent bien que, là encore, le poids des microbes récoltés n'est pas
proportionnel à la richesse du milieu :

LIQUIDE DE DIGESTION AJOUTÉ À 100 CM ³ DE MILIEU	POIDS DES BACILLES RÉCOLTÉS
20 cm ³	0 ^{gr} ,90
10 cm ³	0 ^{gr} ,97
5 cm ³	0 ^{gr} ,91
2 cm ³	0 ^{gr} ,70

Enfin A. FROUIN et M^{lle} M. GUILLAUMIE (73), en étudiant l'influence de
la concentration de la glycérine, dans les milieux synthétiques, sur le
rendement en poids du bacille tuberculeux trouvent encore des résultats
du même ordre ainsi que le montre le tableau suivant :

QUANTITÉ DE GLYCÉRINE POUR 100 CM ³	POIDS DES MICROBES DANS 100 CM ³
0 ^{gr} ,29	0 ^{gr} ,066
0 ^{gr} ,82	0 ^{gr} ,179
2 ^{gr} ,65	0 ^{gr} ,241
5 ^{gr} ,28	0 ^{gr} ,259

Tous les milieux naturels utilisés permettent un bon développement du
bacille pyocyanique. Ils paraissent tous contenir une proportion suffi-
sante de substances nutritives, mais les méthodes d'analyses utilisées ne
nous ont pas permis de voir pourquoi la multiplication microbienne
s'arrêtait brusquement après la 30^e ou la 48^e heure. En tout cas cet
arrêt ne doit pas être attribué à l'épuisement du milieu, tout au moins
en ce qui concerne les éléments principaux. En effet, au moment de la
filtration, la proportion des éléments enlevés au liquide est la suivante :

	EAU PEPTONÉE salée	PREMIÈRE MACÉRATION de viande	BOUILLON PEPTONÉ salé	BOUILLON LIEBIG	BOUILLON MARTIN	DEUXIÈME MACÉRATION de viande
	pour 100	pour 100	pour 100	pour 100	pour 100	pour 100
Az total disparu.. . . .	14,1	16	9,3	5,2	7,5	22
Az aminé disparu.	54,3	39	24,7	23	35,8	50
C total disparu.	5,5	10,4	8,1	7,2	8,3	29,8
P total disparu.	54,1	15,4	8,2	21,3	6,8	

Si la deuxième macération de viande a perdu 22 pour 100 de son azote
et 30 pour 100 de son carbone, et si l'eau peptonée a perdu 54 pour 100

de son phosphore, les autres bouillons sont loin de ces chiffres et devraient permettre un développement microbien plus intense. La théorie de l'épuisement du milieu, soutenue d'abord par PASTEUR, ne semble donc pas valable.

L'arrêt de la multiplication ne peut donc être produit que par une alcalinisation trop grande des liquides de culture, par la formation de substances inhibitrices ou la disparition de principes indispensables qui échappent à l'analyse ordinaire (hormones de croissance par exemple), ou par des phénomènes encore inconnus. L'alcalinisation, à elle seule, ne suffit sans doute pas pour expliquer l'arrêt de la croissance microbienne. LIOT (128) a en effet montré, mais sans utiliser la notation des pH, que le bacille pyocyanique était susceptible de se développer dans des milieux fortement alcalinisés par l'ammoniaque.

4° VALEUR NUTRITIVE DES DIFFÉRENTS MILIEUX UTILISÉS. — Si l'on considère le nombre des bacilles produits par un seul ensemencement, sans tenir compte des cultures secondaires qu'on pourrait sans doute obtenir en réensemencant les cultures filtrées à la bougie, on constate que les chiffres trouvés pour les différents milieux naturels sont assez voisins les uns des autres. Dans ces conditions il est assez difficile de faire un choix entre ces liquides. Cependant le bouillon LIEBIG semble peu favorable à la conservation de la vitalité et l'eau peptonée paraît assez pauvre en phosphore, puisque la multiplication microbienne y provoque la disparition de plus de 50 pour 100 de cet élément.

D'autre part on peut considérer qu'un bon bouillon de culture doit permettre une fixation importante d'azote, de carbone et de phosphore par les bactéries tout en ne produisant qu'une faible quantité d'ammoniaque, substance se comportant ici comme un déchet et finissant peut-être par être toxique.

Dans ces conditions on a, du meilleur au pire :

- 1° Première macération de viande ;
- 2° Bouillon peptoné salé ;
- 3° Bouillon MARTIN.

Il est bien évident que ces résultats ne s'appliquent qu'au bacille pyocyanique, germe facile à cultiver. Il est cependant à noter que nous retrouvons ici, comme milieu favorable, la simple macération de viande déjà préconisée par GRIMBERT (89). Enfin la deuxième macération de viande, milieu pauvre en substances dissoutes et d'un prix de revient presque nul, puisqu'il est obtenu avec les déchets résultant de la préparation d'un autre bouillon, nous a donné, dans ce cas, des résultats encore fort intéressants.

CONCLUSIONS

I. — *Dans un premier chapitre*, après avoir présenté les techniques utilisées par les différents auteurs pour dénombrer les micro-organismes, nous avons exposé les deux méthodes mises au point par nous pour arriver au même but.

La première consiste en une numération microscopique comparée entre les microbes dont nous voulons trouver le nombre et des cellules de levure dont nous connaissons le titre. Cette méthode nous donne *tous les microbes visibles* c'est-à-dire :

- a) les germes en pleine force, capables de se reproduire sur milieux solidifiés ;
- b) les bactéries de vitalité plus faible, qui ne peuvent se multiplier que dans leur milieu liquide originel ;
- c) les microbes incapables de toute reproduction et sur le point de subir l'autolyse.

La deuxième méthode est la technique classique utilisée par tous les auteurs (sauf BARBER) qui se sont occupés de la question. Elle consiste à compter les colonies qui se sont développées sur gélose après ensemencement d'une quantité connue de l'émulsion microbienne. Nous insistons sur ce fait que ce procédé ne saurait nullement donner le nombre des microbes viables, comme l'ont dit tous les auteurs, mais uniquement les microbes nés dans un milieu liquide et capables cependant de se reproduire dans un milieu solide (bouillon gélifié) différent de leur milieu d'origine.

II. — *Dans un deuxième chapitre* nous avons résumé les principaux travaux qui ont trait à la multiplication bactérienne. Nous avons montré que, d'après les différents auteurs, cette multiplication peut se diviser en plusieurs phases :

- 1. Une phase de latence.
- 2. Une phase de multiplication régulière et rapide (phase géométrique ou phase logarithmique) pendant laquelle le temps de génération se maintient constant.
- 3. Une phase de multiplication ralentie.
- 4. Une phase de multiplication nulle.

5. Des phases de mort.

Après avoir exposé les différentes hypothèses émises par les bactériologistes étrangers pour expliquer l'existence de la phase de latence, nous avons examiné les causes qui, d'après quelques auteurs, provoquent l'arrêt de la multiplication bactérienne et finalement la mort des microbes. Il est à remarquer que les travaux qui se rapportent à cette deuxième question sont moins nombreux, et moins complets, que ceux qui sont relatifs à la phase de latence.

III. — Dans les deux chapitres suivants, où nous présentons nos travaux personnels, nous avons étudié la multiplication du bacille pyocyanique dans différents milieux de culture liquides.

Pour cela, *dans le troisième chapitre*, nous avons suivi, à l'aide des deux méthodes précédemment exposées, la multiplication de ce bacille dans un certain nombre de milieux ordinaires (eau peptonée simple, eau peptonée salée, macération de viande riche en principes nutritifs, macération de viande pauvre en éléments nutritifs, bouillon peptoné salé, bouillon MARTIN, bouillon LIEBIG) et dans deux milieux synthétiques (milieu de LIOT et milieu de AUBEL ajustés tous deux à pH 7,0). Nos expériences ont été faites à partir d'une souche de bacille pyocyanique entretenue sur bouillon gélosé. Chaque ensemencement a été effectué à l'aide d'une culture âgée de 24 heures, développée à 37°, et à raison de 500 000 germes visibles par centimètre cube.

Les résultats obtenus sont les suivants :

a) La phase de latence, dont nous avons constaté l'existence, comme tous les auteurs étrangers, en employant la méthode de numération par ensemencement sur gélose, ne se retrouve plus lorsqu'on utilise la numération directe au microscope. Dès la première heure les microbes visibles se multiplient avec la plus grande vitesse et nous entrons tout de suite dans la phase logarithmique. Ces résultats, qui confirment ceux trouvés par J. RÉGNIER, S. LAMBIN et A. KAPLAN, prouvent que pendant toute la première période de la croissance bactérienne (deux ou trois premières heures), il se fait seulement une multiplication de microbes de vitalité faible, incapables de se développer sur gélose solidifiée. La phase de latence n'existe donc que si l'on tient compte, uniquement, des microbes en pleine vitalité capables de se reproduire sur milieux solides.

b) Dans la phase logarithmique suivante nous assistons peu à peu à une augmentation du nombre des germes capables de se reproduire sur gélose. Ce nombre tend à se rapprocher de celui des microbes visibles, sans cependant parvenir à le rejoindre. La phase de multiplication ralentie se produit plus rapidement pour les microbes de pleine vitalité que pour les bacilles visibles, le maximum atteint par les premiers est sensiblement plus précoce que le maximum atteint par les seconds et lui est toujours inférieur.

c) La longueur des microbes varie avec l'âge de la culture. Conformément aux résultats trouvés par J. RÉGNIER et A. KAPLAN, résultats qui

confirment les travaux des auteurs américains (CLARK et RUEHL, HENRICI), il se produit un allongement des bacilles au début de la phase logarithmique. La taille des bacilles commence à diminuer au moment du ralentissement de la multiplication et redevient normale lorsque le maximum est atteint. Ces variations sont particulièrement nettes dans les milieux synthétiques ; on y observe, en effet, au moment de la phase logarithmique, des formes très longues, souvent accolées parallèlement et prenant le colorant d'une façon intense.

d) La comparaison des chiffres obtenus et du rythme des multiplications microbiennes, dans les différents milieux utilisés, montre que ces valeurs sont voisines dans tous les milieux ordinaires (phase de latence d'une durée de 2 à 3 heures, phase logarithmique se prolongeant de 2 heures à 6 heures pour les bacilles capables de se reproduire sur gélose, temps de génération correspondants de l'ordre de 30 à 35 minutes). Pour les milieux synthétiques, au contraire, nous constatons que les maximums atteints sont beaucoup plus faibles que dans les milieux naturels, que la phase de latence, toujours plus longue (au moins 6 heures), peut présenter des valeurs considérables (plus de 22 heures) et que les temps de génération, au cours de la phase logarithmique, sont toujours plus grands que pour les bouillons ordinaires (de l'ordre de 100 minutes).

Au point de vue pratique nous concluons que les milieux simples comme l'eau peptonée et surtout la macération de viande donnent des résultats sensiblement équivalents à ceux qui sont fournis par des bouillons de préparation plus complexe, tandis que les milieux synthétiques sont loin de se montrer aussi favorables. Enfin l'addition de chlorure de sodium à l'eau peptonée simple semble pratiquement sans influence sur la multiplication microbienne.

IV. — *Dans le quatrième chapitre* nous avons cherché à estimer la valeur nutritive des différents milieux naturels à l'aide de mesures physiques (tension superficielle, pH, déviation polarimétrique) ou de dosages chimiques (azote total, azote aminé, azote ammoniacal, carbone, phosphore, soufre et chlore). En comparant ensuite la composition d'un milieu stérile à la composition du même milieu ensemencé, puis débarrassé des corps microbiens par filtration à la bougie au moment où la multiplication bactérienne s'arrête (48^e heure), nous avons observé que le développement bactérien provoque les modifications suivantes.

1. La tension superficielle augmente. Le nombre des gouttes données par 5 centimètres cubes de liquide décroît rapidement pendant les deux premiers jours de la culture et tombe par exemple de 129 à 116.

2. L'alcalinité du milieu augmente et la réaction passe de pH 7,0 à pH 8,0 ou 8,4.

3. La déviation polarimétrique diminue, tout au moins dans les cas où la lecture a été possible.

4. L'azote total diminue nettement. Une partie de l'azote du milieu est en effet utilisée pour la constitution du protoplasme bactérien.

L'azote aminé décroît également et peut même disparaître complètement au bout de 9 jours de culture.

L'azote ammoniacal augmente sans cesse et peut atteindre, au 9^e jour de la culture, des chiffres dix fois plus grands qu'au départ.

5. Le carbone total décroît sans qu'il paraisse possible d'établir une relation nette entre l'importance de cette diminution et la richesse en carbone du milieu initial.

6. Si la quantité de soufre fixée par les bactéries paraît assez faible et irrégulière il n'en est pas de même pour le phosphore. Dans ce dernier cas les diminutions observées sont toujours nettes et peuvent atteindre, dans le cas de milieux pauvres en phosphore (eau peptonée par exemple), la moitié de la quantité mise en œuvre.

7. Le rôle du chlore semble négligeable et la multiplication du bacille pyocyanique paraît indépendante de la concentration de cet élément. Il est d'ailleurs intéressant de signaler que des milieux classiques, comme l'eau peptonée salée et le bouillon LIEBIG, qui devraient avoir la même pression osmotique, peuvent présenter des teneurs en chlorure de sodium qui varient de 5^{gr},55 à 8^{gr},15 pour 1000.

Si, pour les différents milieux, on calcule les quantités des différents éléments utilisées pour la constitution de un milliard de bacilles, on remarque que les valeurs ainsi obtenues sont loin d'être semblables. Nous sommes donc conduits à admettre que les différences ainsi observées, et particulièrement celles qui se rapportent aux variations de l'azote total, sont attribuables à des différences de la constitution chimique des bactéries.

En comparant des dosages effectués sur le même milieu ensemencé à la 48^e heure de la culture et après 9 jours de séjour à l'étuve, on constate que tandis que la diminution de l'azote total, relativement très importante pendant les deux premiers jours, devient négligeable par la suite, les variations de l'azote ammoniacal et de l'azote aminé se poursuivent régulièrement. Nous voyons donc que quand les bactéries (ferments figurés) se détruisent, les ferments solubles, mis en liberté, continuent leur action, et que, par conséquent, les modifications chimiques ne sont pas forcément parallèles au développement microbien.

D'un point de vue général nous pouvons dire que si la richesse d'une culture augmente avec la quantité de matières organiques contenues dans le milieu, les deux augmentations sont loin d'être proportionnelles. Nous constatons également que la multiplication cesse à un moment où il reste encore dans le liquide de culture de très fortes quantités de matières nutritives (tout au moins parmi celles que nous avons dosées). *Il semble donc que l'arrêt du développement bactérien est produit par un autre facteur que par l'épuisement du milieu.*

D'un point de vue pratique nous pouvons, dès maintenant, conclure que les milieux les plus riches en matières protéiques ne sont pas les plus favorables. Dans certains cas une trop grande abondance de produits azotés paraît même être nuisible. Nous devons encore nous demander si la quan-

tité de chlorure de sodium ajoutée de façon systématique aux bouillons de culture (vraisemblablement pour créer une pression osmotique favorable), n'est pas exagérée. Nous avons vu en effet que le microbe n'absorbait que très peu ou pas de chlore, et nous savons, d'autre part, que les bactéries peuvent se détruire assez rapidement dans l'eau salée physiologique.

Le bacille pyocyanique se développe normalement dans tous les milieux naturels étudiés. Il semble assez difficile de faire un choix parmi tous ces liquides. Cependant, en tenant compte de la survie plus ou moins longue des germes, et en considérant qu'une production trop importante d'ammoniaque est l'indice d'un mauvais rendement, nous sommes amenés à admettre que les milieux les plus favorables pour la multiplication du bacille pyocyanique sont, du meilleur au pire :

- 1° première macération de viande ;
- 2° bouillon peptoné salé ;
- 3° bouillon MARTIN.

Les essais chimiques, dont nous venons d'exposer les conclusions principales, ne sont que des essais préliminaires. Nous les poursuivrons en essayant d'améliorer les méthodes d'analyse et en cherchant à connaître, par la méthode que nous venons d'exposer, le rôle des éléments minéraux (K, Na, Ca, Mg, Fe, etc...). Nous aborderons ensuite l'étude de nouveaux milieux en insistant particulièrement sur le rôle des matières sucrées.

INDICATIONS BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABDERHALDEN (E.). — Die Verwendung der Gewichts- und Abnahme automatischregistrierender Wage. *Fermentforschung*, 1915, 1, p. 155 et 229.
2. ABT (G.) et LOISEAU (G.). — Sur les facteurs des variations de pH dans les cultures de bacille diphthérique. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1925, 39, p. 114.
3. ALLEN (P. W.). — The attenuation of bacteria due to temperature shock. *Journ. of Bact.*, 1923, 8, p. 555.
4. ARNAUD (A.) et CHARRIN (A.). — Recherches chimiques sur les sécrétions microbiennes. Transformation et élimination de la matière organique azotée par le bacille pyocyanique dans un milieu de culture déterminé. *C. R. Ac. Sc.*, 1891, 112, p. 755.
5. ARNAUD (A.) et CHARRIN (A.). — Recherches chimiques et physiologiques sur les sécrétions microbiennes. Transformation et élimination de la matière organique par le bacille pyocyanique. *C. R. Ac. Sc.*, 1891, 112, p. 1157.
6. AUBEL (E.). — *Recherches biochimiques sur la nutrition du bacille pyocyanique*. Imprimerie E. Lanier, Caen, 1921.
7. AVERY (O. T.), GLENN et CULLEN. — Hydrogen ion concentration of cultures of pneumococci of the différents types in carbohydrate media. *Journal of experim. Med.*, 1919, 30, p. 360.
8. BACH (D.). — Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. *Th. Doct. ès sc.*, André Brulliard, Saint-Dizier, 1925.
9. BACHRACH (E. D.). — Accoutumance et anaphylaxie chez le bacille lactique. *Thèse Doct. ès sc.*, Paris, 1924.
10. BARBER. — The rate of multiplication of *Bacillus coli* at différents temperatures. *Journ. of inf. Diseases*, 1908, 5, p. 379.
11. BERZELLER (A.). — Milieu nutritif simple. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 98, p. 1097.
12. BERDNIKOW (A.). — Sur une technique de précipitation des protides dans les bouillons peptonés. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, 95, p. 1342.
13. BERDNIKOW (A.). — Sur la marche de la protéolyse dans les cultures de bacilles dysentériques. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 98, p. 210.
14. BERTHELOT (A.), RAMON (G.) et M^{lle} AMOUREUX. — Recherches biochimiques sur les toxines et leurs dérivés. Etude des facteurs qui influencent l'élaboration de la toxine tétanique et sa transformation spontanée en anatoxine. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1927, 41, p. 83.
15. BERTHELOT (A.) et M^{lle} CHADUC (M.). — Sur l'indice d'iode des peptones commerciales. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, 8, p. 936.
16. BERTHELOT (A.). — Remarques sur l'emploi des milieux synthétiques. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1926, 40, p. 440.
17. BESREDKA (A.). — Etude sur l'immunité locale. Le pansement antistaphylococcique. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 7.

18. BESREDKA (A.). — Etude sur l'immunité locale. Staphylocoque : cuti-vaccination et cuti-immunité. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 88, p. 1273.
19. BESREDKA (A.) et URBAIN (A.). — Etude sur l'immunité locale. Le pansement antistreptococcique. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 506.
20. BESREDKA (A.) et GOLOVANOFF (M.). — De la vaccination anticholérique. Etude sur l'immunité locale. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 933.
21. BEZANÇON (F.). — *Précis de microbiologie clinique*. 3^e édit., 1 vol., Paris, Baillière, 1926.
22. BIERNACKI (E.). — Ueber die Eigenschaft der Antiseptica, die Alkoholgärung zu beschleunigen und über gewisse Abhängigkeit ihrer Kraft von der chemischen Baustruktur, der Fermentmenge und der Vereinigung miteinander. *Pflüger's Arch.*, 1891, 49, p. 112.
23. BOEZ (L.). — Milieu de culture pour le bacille tuberculeux à base de peptone pancréatico-intestinale. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1926, 40, p. 746.
24. BOLAND. — *Inaug. Dissert.*, Amsterdam, 1902 (d'après J. LANE CLAYPON).
25. BREED (R.) et BREW (J.). — Counting bacteria by means of the microscope. *Technical bulletin n° 49. New-York Agricult. Exper. Station*, 1916, p. 1-31 (d'après BUCHANAN et FULMER).
26. BRUNNER (G.) et ZAWADZKI (A.). — Zählplatte zu den Petri'schen Schalen. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1893, 14, p. 616.
27. BUCHANAN (R. E.). — Life phases in bacterial cultures. *Journ. of inf. Diseases*, 1918, 23, p. 109.
28. BUCHANAN (R. E.). — Growth curves of bacteria. In *the Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology* de JORDAN (E. O.) et FALK (I. S.), chapitre v, p. 46.
29. BUCHANAN (R. E.) et FULMER (E. J.). — *Physiology and Biochemistry of Bacteria*. 1 vol., Baillière, Tindall and Cox, London, 1928.
30. BUCHANAN (R. E.) et FULMER (E. J.). — Growth phases and growth rates in cultures of microorganisms, in *Physiology and Biochemistry of Bacteria*, chapitre II, p. 4.
31. BÜCHNER (H.), LONGARD (K.) et RIEDLIN (G.). — Über die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1887, 2, p. 1-6.
32. BURGESS (K. E.). — The toxicity towards staphylococcus of dilute phenol solutions containing sodium benzoate. *Journ. of Phys. Chem.*, 1920, 24, p. 738.
33. CALMETTE (A.), NÈGRE (L.) et BOQUET (A.). — *Manuel technique de microbiologie et sérologie*. 2^e édit., 1 vol., Paris, Masson, 1926.
34. CARDOT (Ch.) et CARDOT (H.). — Analogie entre les ferments lactiques et les streptocoques au point de vue de l'action des antiseptiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1917, 165, p. 272.
35. CARLSON (T.). — Über Geschwindigkeit und Grösze der Hefevermehrung in Würze. *Biochem. Ztschr.*, 1913, 57, p. 313.
36. CHATRON (M.). — Etude de deux microméthodes de dosage de l'ion SO_4 . Application au dosage du soufre sanguin. *Th. Doct. Pharmacie*, Girault, Saint-Cloud, 1930.
37. CHESNEY (ALAN M.). — The latent period in the growth of bacteria. *Journ. of experim. Med.*, 1916, 24, p. 387.
38. CHICK (MISS H.). — The bactericidal properties of blood serum. *Journ. of Hygiene*, 1912, 12, p. 414.
39. CLARK (P. F.). — Morphological Changes during the Growth of Bacteria in *New. Knowledge of Bact. and Im.* de JORDAN et FALK, chapitre IV, p. 38.
40. CLARK (P. F.) et RUEHL (W. H.). — Morphological changes during the growth of bacteria. *Journ. of Bact.*, 1919, 4, p. 615.

41. LANE CLAYPON (JANET E.). — Multiplication of bacteria and the influence of temperature and some other conditions. *Journ. of Hygiene*, 1909, 9, p. 239.
42. COHEN (BARNETT) et CLARK (MANSFIELD). — The growth of certain bacteria in media of different hydrogen ion concentrations. *Journ. of Bact.*, 1919, 4, p. 409.
- 42'. COPAUX (H.). — Procédé rapide pour doser l'acide phosphorique. *C. R. Ac. Sc.*, 1921, 173, p. 656.
43. COPLANS (MYER). — Influences affecting the growth of microorganisms. Latency. Inhibition. Mass action. *Journ. of Pathology and Bact.*, 1910, 14, p. 1.
44. COURMONT (P.), MOREL (A.) et BAY (I.). — Sur les modifications de la réaction et de l'azote ammoniacal dans les cultures homogènes du bacille tuberculeux humain A en milieu défini à base d'ammoniaque. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, 94, p. 864 ; 1926, 95, p. 41.
45. COURMONT (P.), MOREL (A.) et BAY (I.). — Sur la réaction et la teneur en azote ammoniacal et aminé des cultures en bouillon peptoné glyciné du bacille tuberculeux humain homogène A. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, 93, p. 1310.
46. GRADY (MAC M. H.). — The numerical interpretation of fermentation tube results. *Journ. of inf. Diseases*, 1915, 17, p. 183.
47. GRADY (MAC M. H.). — Tables for rapid interpretation of fermentation tubes results. *Pub. Health. J. Toronto*, 1918, 9, p. 201 (d'après BUCHANAN).
48. GRAMER (W.). — Die Wasserversorgung von Zürich und ihr Zusammenhang mit der Typhusepidemie des Jahres 1884. Zurich, 1885 (d'après WINSLOW).
49. GRAMER (E.). — Die Aschebestandteile der Cholerabacillen. *Arch. f. Hyg.*, 1897, 28, p. 1-15.
50. DAVISON. — *Journ. Amer. Med. Ass.*, 1916, 66, p. 1 297 (d'après F. VLÈS).
51. DERNBY et AVERY. — The optimum hydrogen ion concentration for the growth of *Pneumococcus*. *Journ. of experim. Med.*, 1918, 18, p. 345.
52. DERNBY (K. G.). — La concentration optima en ions hydrogène favorisant le développement de certains micro-organismes. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1921, 35, p. 277.
53. DOPTER (CH.) et SACQUÉPÉE (E.). — *Précis de bactériologie*. 3^e édit., 2 vol., Paris, Baillière, 1926.
54. DREYER, DUNCAN et GARDNER. — A general method of estimating the relative turbidity or opacity of fluid suspension including bacterial emulsions. *Biochem. Journ.*, 1916, 10, n° 3, p. 399.
55. DREYER (G.). — A simple procedure for the accurate numeration of blood cells and bacteria, without the use of a counting chamber. *The Lancet*, 29 janvier 1921, 200, p. 219.
56. DUCLAUX. — *Traité de microbiologie*. 1902, 4, fermentation lactique, p. 311 à 373.
57. DUTHOIT (A.). — Action sur différents microbes du chlorure de sodium à divers taux de concentration. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 550.
58. DUTHOIT (A.). — De l'action sur différents microbes du chlorure de sodium seul ou associé à d'autres sels. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 553.
59. EFFRONT (J.). — Influence de la constance du milieu sur le développement et le travail chimique des microorganismes. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 91, p. 1175.
60. EIJKMAN (C.). — Über thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachstumshemmung der Mikroorganismen. *Centralblatt für Bakt. und Par., Originale*, 1904, 37, p. 436.
61. ELLERMANN et ERLANDSEN. — Technique de numération des colonies visibles (d'après HANS HECKSCHER, *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 84, p. 1039).

62. ESMARCK. — *Ztschr. für Hygiène*, 1886, 1, p. 293.
63. ESTY (J. R.) et MEYER (K. F.). — The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobies. *Journ. of inf. Diseases*, 1922, 31, p. 650.
64. FALK (I. S.). — The role of certain ions in bacterial physiology. A review (Studies on salt action). *Abstr. of bact.*, janvier 1923, 7, p. 33.
65. FLEURY (P.) et LEVALTIER (H.). — Recherches sur le dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl et ses modifications. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1924, 29, p. 137 et 30, p. 265.
66. FOKKER (A. P.). — *Ztschr. für Hygiene und Infektionskrankh.*, 1890, 9, p. 41 (d'après WINSLOW).
67. FRANKLAND. — *Ztschr. für Hygiene*, 19 (d'après EIJKMAN).
68. FRASER (C. G.). — The action of methylene-blue and certain other dyes on living and dead yeast. *Journ. of Phys. Chem.*, 1920, 24, p. 741.
69. FRASER (C. G.). — Methylene-blue as indicator in determining the toxicity of phenol and phenol-salt solutions towards yeast. *Journ. of Phys. Chem.*, 1921, 25, p. 1.
- 69'. FRIEDLEIN (F.). — Der quantitative Verwendungsstoffwechsel des Paratyphus-B-Bazillus, des *Bacterium coli* und des *Bacillus pyocyaneus*. *Biochem. Ztschr.*, 1928, 194, p. 273.
70. FRIES. — Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakteriensuspensionen. *Centralblatt für Bakt., Originale*, 1921, 86, p. 90.
71. FROUIN (A.) et M^{lle} GUILLAUMIE (M.). — Nutrition minérale du bacille tuberculeux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, 8, p. 1151.
72. FROUIN (A.) et M^{lle} GUILLAUMIE (M.). — Nutrition carbonée du bacille tuberculeux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, 8, p. 1178.
73. FROUIN (A.) et M^{lle} GUILLAUMIE (M.). — Influence de la concentration du phosphore et du potassium sur le développement du bacille tuberculeux. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, 94, p. 1115.
74. FROUIN (A.) et M^{lle} GUILLAUMIE (M.). — Culture du bacille tuberculeux sur milieux synthétiques. Essai de généralisation de la notion d'équilibre entre les éléments constitutifs des milieux de culture. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1928, 42, p. 667.
75. FÜLLER (G. W.). — *Ann. Rep., State Board of Health of Massachusetts for 1894, 1895*, 26, p. 461 (d'après WINSLOW).
76. FULMER (E. I.). — The effect of alcohol on the toxicity of phenol towards yeast. *Journ. of Phys. Chem.*, 1921, 25, p. 10.
77. FULMER (E. I.). — The acclimatization of yeast to ammonium fluoride and its reversion in wort. *Journ. of Phys. Chem.*, 1921, 25, p. 455.
78. GALIMARD (J.) et LACOMME (L.). — Les acides aminés comme nouveaux milieux de culture chimiquement définis pour l'étude des microbes. *Journ. Physiol. et Path. gén.*, 1907, 9, p. 481.
79. GATES (Fr.). — The effect of carbon dioxide in the cultivation of the meningococcus. *Journ. of experim. Med.*, 1919, 29, p. 321.
80. GATES (Fr.). — A method of standardizing bacterial suspensions. *Journ. of experim. Med.*, 1920, 34, p. 105.
81. GESSARD (C.). — Diagnose pigmentaire du bacille pyocyaneux. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1919, 33, p. 241.
82. GESSARD (C.). — Technique d'identification des germes pyocyaniques. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1920, 34, p. 88.
83. GLYNN (E.), POWEL (M.), REES (A. A.) et COX (G. L.). — Observations upon the standardisation of bacterial vaccines by the Wright, the hæmocytometer and the plate culture methods. *Journ. of Pathology and Bact.*, 1913-1914, 18, p. 379.

84. GORIS (A.) et LIOT (A.). — Observations sur la culture du bacille pyocyanique sur milieux artificiels définis. *C. R. Ac. Sc.*, 1921, 172, p. 1622.
85. GOSIO. — *Boll. della R. Acc. Med. di Roma*, 1917, 42, p. 3-4 (d'après F. VLÈS).
86. GOTSCHLICH et WEIGANG. — Über die Beziehung zwischen Virulenz und Individuenzahl einer Cholerakultur. *Ztschr. für Hygiene*, 1895, 20, p. 376.
87. GREENWOOD (M.) et YULE G. UDNY. — On the statistical interpretation of some bacteriological methods employed in wateranalysis. *Journ. Hyg.*, 1917, 16, p. 36-54.
88. GRIGAUT (A.). — Le dosage de l'acide urique dans le sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1922, 4, p. 11.
89. GRIMBERT (L.). — Diagnostic des bactéries par leurs fonctions bio-chimiques. *Th. Doct. méd.*, Librairie scientifique et littéraire. Rudeval, Paris, 1903.
90. GRIMBERT (L.). — Les bactéries dénitrifiantes et le mécanisme de la dénitrification. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1904, 2, p. 937.
91. GUIART (J.) et GRIMBERT (L.). — *Diagnostic chimique, microscopique et parasitologique*. 4^e édit., 1 vol., Paris, Lamarre, 1922, p. 827-830.
92. GUILLEMIN (M.) et LARSON (N. P.). — The relation between the fixed and free salts of bacteria. *Journ. of inf. Diseases*, 1922, 31, p. 349.
93. HARRISON (W. S.). — *Journ. Roy. Inst. Publ. Health*, London, 1905, 4, p. 313 (d'après GLYNN).
94. HARVEY. — The tinturometer. *Ind. Journ. Med. Res.*, 1919, 7, p. 346-352 (d'après F. VLÈS).
95. HECKSCHER (HANS). — Méthode pour la numération microscopique des bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 84, p. 1039.
96. HECKSCHER (HANS). — Détermination néphélométrique des émulsions bactériennes. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 85, p. 378.
97. HECKSCHER (HANS). — Nouvelle méthode pour la numération des bacilles vivants contenus dans une émulsion. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 85, p. 612.
98. HEHEWERTH (F. H.). — Die mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien von Alex. Klein, und einige Anwendungen derselben. *Archiv. für Hygiene*, 1901, 39, p. 321.
99. HENRICI (A. T.). — A statistical study of the form and growth of a spore bearing bacillus. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1921, 19, p. 132.
100. HENRICI (A. T.). — Differential counting of living and dead cells of bacteria. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1923, 20, p. 293.
101. HENRICI (A. T.). — A statistical study of the form and growth of *Bacterium coli*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1923, 21, p. 215.
102. HENRICI (A. T.). — Influence of age of parent culture on size of cells of *Bacillus megatherium*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1924, 21, p. 343.
103. HENRICI (A. T.). — Influence of concentration of nutriments on size of cells of *Bacillus megatherium*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1924, 21, p. 345.
104. HENRIQUES (O. M.). — Technique de numération des bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 88, p. 819.
105. HESSE (W.). — Über die gasförmigen Stoffwechselprodukte beim Wachstum der Bakterien. *Ztschr. für Hygiene*, 1893, 15, p. 17.
106. HINGLAIS (H.). — Dosage du chlore et du soufre dans les végétaux. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1926, 33, p. 625.
107. HINGLAIS (M^{me} H.). — Sur l'application de la méthode de M. COPAUX au dosage de petites quantités de phosphore dans les tissus. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, 9, p. 540.
108. HINGLAIS (M^{me} H.). — Contribution à l'étude de la répartition du phosphore dans les organes des vertébrés. *Th. Doct. ès sc.*, Lons-le-Saunier, Declume, 1928.

109. HOLLANDE (A. CH.) et CRÉMIEUX (G.). — Méthode de numération directe des bacilles de KOCH. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, p. 122.
- 109'. JAVILLIER (M.) et GUÉRITHAULT (B.). — Sur la distinction des peptones médicinales d'origine pepsique et d'origine pancréatique. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1910, **17**, p. 63.
110. JORDAN (E. O.) et FALK (I. S.). — The newer knowledge of bacteriology and immunology. *The university of Chicago press*, 1928.
111. KENDRICK (MAC) et PAI. — The rate of multiplication of microorganisms. A mathematical study. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, 1911, **21**, p. 649 (d'après GRAHAM SMITH).
112. KIESEL (A.). — Recherches sur l'action de divers acides et sels acides sur le développement de l'*Aspergillus niger*. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1913, **27**, p. 391.
113. KLEBS. — *Arch. für exp. Path. und Pharm.*, 1873, **1**.
114. KLEIN (ALEX.). — Eine einfache Methode zur Sporenfärbung. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1899, **25**, p. 376.
115. KLEIN (ALEX.). — Eine neue mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1900, **27**, p. 834.
116. KLEIN (ALEX.). — Über die Dosierung der Schutzimpfstoffe. *Berlin. klin. Wochenschrift*, 10 avril 1916, p. 395-399.
117. KOBER. — Nephelometry in the study of proteases and nucleases. *Journ. of biol. Chem.*, 1913, **13**, p. 485.
118. LAFAR (FRANZ). — Eine neue Zählvorrichtung für Plattenkulturen in Petri'schalen. *Ztschr. für Nahrungsmitteluntersuchung u. s. w.*, Wien, 1893, n° 24, p. 429, d'après *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1894, **15**, p. 331.
119. LAUDAT. — Le dosage du chlore dans le sérum sanguin et dans les liquides albumineux de l'organisme. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1917, **16**, p. 168.
120. LEDINGHAM (J. C. G.) et PENFOLD (W. J.). — Mathematical analysis of the lag phase in bacterial growth. *Journ. of Hygiene*, 1914, **14**, p. 242.
121. LEGROUX (R.) et ELIAVA (G.). — Sur un liquide où se maintient invariable le nombre de bactéries des cultures. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1921, **35**, p. 713.
122. LEMATTE (L.), BOINOT (G.) et KAHANE (E.). — Dosage des minéraux contenus dans les principaux organes utilisés en opothérapie. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1927, **5**, p. 325.
123. LEONE (C.). — *Arch. für Hyg.*, 1886, **4**, p. 168 (d'après WINSLOW).
124. LESCOEUR (L.) et TUROBINSKI (T.). — Modifications de l'appareil du Professeur Desgrez pour le carbone total en vue d'un microdosage par alcalimétrie. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, **10**, p. 606.
125. LESCOEUR (L.) et MANJEAN (M^{lle} S.). — Sur le dosage volumétrique du gaz carbonique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, **10**, p. 523.
126. LESURE (A.) et DUNEZ (A.). — Dosage du soufre dans le sérum sanguin et dans les produits organiques. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1929, **10**, p. 433.
127. LEISHMAN. — *Journ. Roy. Inst. Publ. Health, London*, 1901, **18**, n° 8 p. 461 (d'après GLYNN).
128. LIOT (A.). — Culture du bacille pyocyanique sur milieux chimiquement définis. *Th. Dipl. Pharm. Sup.*, Imprimerie de la Cour d'appel, Paris, 1923.
129. LOTKA (A. J.). — *Elements of Physical Biology*, 1925 (d'après BUCHANAN).
130. LUHRIG (H.) et SARTORI (A.). — Gärungshemmungen zuckerhaltigen Lösungen durch Konservierungsmittel. *Pharm. Zentralblatt*, 1908, **49**, p. 934.
131. MEILLÈRE (G.) et DE SAINT-RAT. — Dosage de l'azote total. Disposition pour recueillir l'ammoniaque. Application au dosage des albumines du lait. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1922, **25**, p. 100.

132. MESTREZAT (W.). — Formol-titration des acides aminés en solution aqueuse ou dans l'urine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1919, 1, p. 107.
133. MESTREZAT (W.). — Note de laboratoire sur l'emploi de quelques indicateurs colorés. L'alizarine-sulfonate de soude sensibilisée. *Journ. Pharm. et Chim.* 1920, 21, p. 185.
134. MESTREZAT (W.) et JANET (M^{lle} M. P.). — Présence dans l'urine d'un reste azoté que ne dose pas la méthode de KJELDAHL. Étude comparée des résultats fournis dans quelques cas par la technique de KJELDAHL-FOERSTER et la méthode de DUMAS. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1921, 3, p. 88.
135. MESTREZAT (W.) et JANET (M^{lle} M. P.). — L'azote titrable par la méthode de KJELDAHL. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1921, 3, p. 105.
136. MESTREZAT (W.) et JANET (M^{lle} M. P.). — Dosage de l'ammoniaque urinaire par le procédé à la cloche de SCHLOESING. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1922, 4, p. 154.
137. MESTREZAT (W.) et JANET (M^{lle} M. P.). — La formation du nitrile glucoheptonique dans les urines sucrées cyanurées, cause d'erreur pour le dosage de l'ammoniaque. Valeur de la méthode de SCHAFER au carbonate de soude. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1923, 5, p. 464.
138. MESTREZAT (W.). — L'azote urinaire non titrable par la méthode de KJELDAHL. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, 8, p. 341.
139. MICHAELIS (L.) et MARCORA (F.). — Die Säureproduktivität des *Bacterium coli*. *Ztschr. für Immunitätsforschung und exp. Therapie*, 1912, 14, p. 170-173.
140. MILLER. — Einige kurze Notizen in Bezug auf bakteriologische Untersuchungsmethoden. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1894, 15, p. 894.
141. MILLER (W. L.). — Toxicity and chemical Potential. *Journ. of Phys. Chem.*, 1920, 24, p. 562.
142. MIQUEL (P.). — Nouvelles recherches sur les poussières organisées de l'atmosphère. *Annuaire de l'Observatoire de Montsouris*, 1880, 9, p. 386.
143. MIQUEL. — Instructions relatives à l'analyse micrographique des eaux. *Revue d'hygiène*, 1887, 9, p. 725.
144. MIQUEL. — *Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux*. 1 vol., Paris, Gauthier-Villars, 1891.
145. MIQUEL (P.) et CAMBIER (R.). — *Traité de bactériologie pure et appliquée à la médecine et à l'hygiène*. 1 vol., Paris, Naud, 1902.
146. MÜLLER (MAX). — Über den Einfluss von Fiebertemperaturen auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Virulenz des *Typhus Bacillus*. *Ztschr. für Hygiene*, 1895, 20, p. 245.
147. NAEGELI et SCHWENDENER. — *Das Mikroskop*, 2^{te} Aufl., 1877, p. 640 (d'après BÜCHNER).
148. NEISSER (MAX). — Die mikroskopische Plattenzählung und ihre spezielle Anwendung auf die Zählung von Wasserplatten. *Ztschr. für Hygiene*, 1895, 20, p. 118.
- 148'. NICLOUX (M.). — La mesure des petits volumes en micro-analyse. Usage de la pipette CORNEC-COTTET. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, 7, p. 750.
149. NICOLLE (M.) et BOQUET (A.). — *Éléments de microbiologie générale et d'immunologie*. 2^e édit., 1 vol., Paris, Doin, 1926.
150. PAINE (SYDNEY). — The permeability of the yeast-cell. *Proc. Roy. Soc. of London*, B, 1911-12, 84, p. 289-307.
151. PENFOLD (W. J.). — On the nature of bacterial lag. *Journ. of Hygiene*, 1914, 14, p. 215.
152. PENFOLD et NORRIS. — The relation of concentration of food Supply to the generation time of Bacteria. *Journ. of Hygiene*, 1912, 12, p. 527.
153. PORCELLI-TITONE. — *Reforma medica*, 31, n° 42 (d'après F. VLÈS).
154. POZERSKI (E.). — Sur l'excrétion des composés phosphorés par les

- microbes. Action du formol à faibles doses. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 27.
155. POZERSKI (E.). — Sur l'excrétion des composés phosphorés par les microbes. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 91, p. 1004.
156. PROUST. — *Revue d'hygiène et de police sanitaire*. 1884 (d'après NEISSER).
157. RAHN (OTTO). — Über den Einfluss der Stoffwechselprodukte auf das Wachstum der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, II Abt., 1906, 16, p. 417 et 609.
158. REED (H. S.) et REYNOLDS (R. R.). — *Techn. Bull.* 10, Va. Agric. Exper. Sta., 1916 (d'après WINSLOW).
159. REGNARD (P.). — Appareil destiné à enregistrer sous forme de courbe continue les phénomènes de la fermentation. *C. R. Soc. Biol.*, 1882, 4, p. 459.
160. RÉGNIER (J.) et LAMBIN (S.). — Introduction à l'étude des antiseptiques. Étude numérique du croît d'un bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1927, 34, p. 401 et 490.
161. RETTGER (LÉO T.). — The science of bacteriology and its relation to other science. *Journ. of Bact.*, 1918, 3, p. 203.
162. RETTGER (LÉO F.). — Protein (Nitrogen) Metabolism of Bacteria, in the *N. knowledge of bact. and imm.* de JORDAN et FALK, chap. xv, p. 218.
163. RICHET (CH.) et CARDOT (H.). — Influence d'élévations thermiques faibles et brèves sur la marche des fermentations. *C. R. Ac. Sc.*, 1916, 163, p. 954.
164. ROBERT (LÉOP.). — Diaphanomètre. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 84, p. 820.
165. ROBERTSON (T. B.). — Reproduction in cell-communities. *Journ. of physiology*, 1922, 56, p. 403.
166. ROBERTSON (T. B.). — *Biochem. Journ.*, 1915, 45, p. 595 (d'après BUCHANAN).
167. SABOURAUD. — Méthode de Sabouraud pour la préparation des vaccins staphylococciques (d'après CALMETTE, NÈGRE et BOQUET, p. 531).
168. SALIMBENI. — Méthode de numération à l'hématimètre (d'après CALMETTE, NÈGRE et BOQUET, p. 534).
169. SCHMIDT (S.). — Sur la production de toxine diphtérique dans le bouillon Martin. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1925, 39, p. 875.
170. SCHULTZ (H.). — Ein Apparat zur graphischen Darstellung von Gärungsvorgängen. *Pflügers Archiv. für d. ges. Phys.*, 1907, 120, p. 51.
171. SELTER (Hugo). — Infektionsversuche mit kleinen Tuberkelbacillennengen mit besonderer Berücksichtigung des Inhalationsweges. *Deut. med. Woch.*, 1916, p. 593.
172. HOLM (G. E.) et SHERMAN (J. M.). — Salt effects in bacterial growth. *Journ. of Bact.*, 1921, 6, p. 511.
173. SHERMAN (J. M.) et HOLM (G. E.). — Salt effects in bacterial growth. II The growth of *Bact. coli* in relation to H-ion concentration. *Journ. of Bact.*, 1922, 7, p. 465.
174. SHERMAN (J. M.), HOLM (G. E.) et ALBUS (W. R.). — Salt effects in bacterial growth. III Salt effects in relation to the lag period and velocity of growth. *Journ. of Bact.*, 1922, 7, p. 563.
175. SHERMAN (J. M.) et ALBUS (W. R.). — Physiological youth in bacteria. *Journ. of Bact.*, 1923, 8, p. 127.
176. SHERMAN (J. M.) et ALBUS (W. R.). — The function of lag in bacterial cultures. *Journ. of Bact.*, 1924, 9, p. 303.
177. SIERAKOWSKI (S), MODRZEWSKA (Z.), RABINOWICZ (H.) et SALAMON (E.). — Recherches sur les milieux de culture. Influence de différents agents sur la croissance des bactéries pathogènes dans les milieux gélosés. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 1386.

178. SLATOR. — The rate of fermentation by growing yeast cells. *Biochem. Journ.*, 1913, 7, p. 197.
179. SLATOR (A.). — A note on the lag phase in the growth of microorganisms. *Journ. Hygiène*, 1917, 16, p. 100.
180. SLATOR (A.). — Yeast crops and the factors which determine them. *Journ. of Chem. Soc.*, 1921, 119, p. 115.
181. SMITH (GRAHAM). — The behaviour of bacteria in fluid cultures as indicated by daily estimates of the numbers of living organisms. *Journ. of Hygiène*, 1920, 19, p. 133.
182. STEIN (M. F.). — The interpretation of *B. coli* test results on a numerical and comparative basis as applied to the investigation of water and sewage. *Journ. of Bact.*, 1919, 4, p. 243.
183. SUPNIEWSKI (J.). — Recherches sur la transformation des combinaisons carbonées par le Bacille pyocyanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 1377.
184. THÖNI (J.) et THAYSEN (A. C.). — Experimentelle Untersuchungen zur Feststellung der Mindestzahl von Bacillen, die beim Meerschweinchen noch Tuberkulose hervorruft. *Centralblatt für Bakt. und Par., Originale*, 1915-16, 77, p. 308.
185. TROESTER. — Verfahren zum Zählen abgetöteter Bakterien in Aufschwemmungen. *Centralblatt originale*, 1922, 88, p. 252.
186. VALLEY (G.) et RETTGER (L. F.). — The influence of carbon dioxide on bacteria. *Journ. of Bact.*, 1927, 14, p. 101.
187. VLÈS (F.). — Sur la signification des dosages bactériens. *C. R. Soc. Biol.*, 1919, 82, p. 373.
188. VLÈS (F.). — Recherches sur quelques propriétés optiques des suspensions biologiques et leur application à l'opacimétrie bactérienne. *Arch. de physique biologique*, 1921, 1, p. 189.
189. WHIPPLE (G. C.). — *Tech. Quart.*, 1901, 14, p. 21 (d'après WINSLOW).
190. WILSON (G. S.). — The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting. *Journ. of Bact.*, 1922, 7, p. 405.
191. WINSLOW (C. E. A.). — The Rise and Fall of Bacterial Populations in the *N. knowledge of bact. and im.*, de JORDAN et FALK, chap. VI, p. 58.
192. WINSLOW (C. E. A.) et BROOKE (OLIVE R.). — The viability of various species of bacteria in aqueous suspensions. *Journ. of Bact.*, 1927, 13, p. 235.
193. WOLMAN (A.) et WEAVER (H. L.). — A modification of the MAC CRADY method of the numerical interpretation of fermentation tube results. *Journ. of inf. Diseases*, 1917, 21, p. 287.
194. WRIGHT (A. E.). — *The Lancet*. London, 1902, 2, p. 11.
195. WRIGHT (A. E.). — *Technique of the Test and Capillary glass tube*. London, Constable and Co, 1912.
196. WUNSCHENDORFF (H.). — La désalbumination ferrique des liquides de l'organisme. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, 7, p. 768.
197. ZEISZLER (J.). — Binokulares Plattenkulturmikroskop. *Centralblatt für Bakt. und Par., Originale*, 1922, 88, p. 430.
198. ZELIKOW (J.). — Quantitative Bestimmung der Bakterialmasse durch die Kolorimetrische Methode. *Centralblatt für Bakt. und Par., Originale*, 1906, 42, p. 570.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages.
INTRODUCTION.	I
CHAPITRE I	
TECHNIQUES UTILISÉES POUR L'ÉTUDE QUANTITATIVE DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE	
I. — Méthodes donnant le nombre total des microbes (« morts » et « vivants ») présents dans la culture.	6
A. — Détermination indirecte du nombre des microbes par volumétrie, pesée, opa- cité et colorimétrie.	6
1° Mesure du volume de la masse microbienne.	6
2° Évaluation du poids de la masse microbienne.	6
3° Évaluation du trouble apporté aux milieux liquides par la masse micro- bienne.	7
4° Évaluation de la quantité de colorant absorbée par la masse microbienne.	10
Critique de ces différentes méthodes.	10
B. — Numération microscopique de la totalité des éléments microbiens.	11
1° Évaluation du nombre des microbes par numération microscopique directe.	12
2° Évaluation du nombre des microbes au moyen d'une cellule compte- microbes.	17
3° Évaluation du nombre des microbes par numération microscopique comparative.	19
II. — Méthodes donnant le nombre des microbes « vivants » présents dans la culture.	22
A. — Détermination du nombre des microbes « vivants » par ensemencements en milieux nutritifs.	23
1° Évaluation du nombre des microbes vivants par dilution et ensemence- ments en milieux liquides.	23
2° Évaluation du nombre des microbes vivants par dilution et ensemence- ments sur milieux solidifiés par la gélatine ou la gélose.	25
3° Comparaison des résultats donnés par les méthodes de numération micro- scopique de la totalité des éléments microbiens aux résultats fournis par les méthodes de numération des microbes vivants par ensemence- ments en milieux nutritifs.	32
B. — Détermination du nombre des microbes « vivants » par examen micro- scopique.	33
1° Évaluation du nombre des microbes vivants par examen morphologique.	33
2° Évaluation du nombre des microbes vivants par numération microscopique après coloration élective.	35
III. — Méthodes basées sur l'activité biochimique des bactéries.	36

IV. — Méthodes personnelles utilisées pour l'étude de la multiplication microbienne dans un milieu liquide.	38
1° Numération des microbes capables de se multiplier sur bouillon gélosé.	38
2° Numération microscopique comparative de la totalité des éléments microbiens.	40

CHAPITRE II

ÉTUDE NUMÉRIQUE DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE

I. — Travaux essentiels relatifs à l'étude numérique de la multiplication microbienne: Büchner, Longard et Riedlin; Muller; Barber.	45
II. — Étude particulière des différentes phases de la multiplication microbienne: Gotschlich et Weigang, Hehewerth, Whipple, Eijkman, Rahn, J. E. Lane Claypon, M. Coplans, Kendrick et Pai, H. Chick, Slator, Penfold, Robertson, Alan M. Chésney, Reed et Reynolds, Buchanan et Fulmer, Rettger, Cohen et Clark, Clark et Ruehl, Graham Smith, Esty et Meyer, Allen, Sherman et Albus, Valley et Rettger, Winslow, etc..	47
A. — Phase de latence.	49
1° Principaux facteurs qui exercent une influence sur la durée de la phase de latence.	50
a) Influence de la constitution des milieux de culture.	50
b) Influence de la température d'incubation.	51
c) Influence de l'espèce microbienne, de son état antérieur et des dommages que les bactéries ont pu subir.	51
d) Influence de l'âge des microbes au moment de l'ensemencement.	52
e) Influence du nombre des microbes ensemencés.	52
2° Hypothèses émises par les différents auteurs pour expliquer l'existence de la phase de latence.	53
a) Théorie de l'adaptation.	53
b) Théorie de l'agglutination.	53
c) Théorie de la sécrétion diastasique.	53
d) Théorie de la sécrétion accélérante subtoxique.	53
e) Théorie de la nécessité de l'apport, par les bactéries ensemencées, d'une substance nécessaire à la multiplication.	54
f) Théorie de la division bactérienne.	54
g) Théorie de l'altération des souches microbiennes.	54
h) Théorie de l'apport, par les bactéries, d'une certaine quantité de substance nuisible.	55
i) Théorie de la sélection.	55
j) Théorie de la synthèse par échelons des corps protoplasmiques.	56
k) Théorie de l'inertie.	56
l) Théorie de la germination.	56
B. — Phase de multiplication logarithmique.	57
Principaux facteurs qui exercent une influence sur les différents caractères de la phase logarithmique.	58
a) Influence de la constitution des milieux de culture.	58
b) Influence de la température d'incubation.	59
c) Influence de l'espèce microbienne.	60
d) Influence de l'âge des microbes au moment de l'ensemencement.	61
e) Influence du nombre des microbes ensemencés.	61
C. — Phase de multiplication ralentie.	61
D. — Phase de maximum stationnaire.	62
E. — Phase de destruction des bactéries.	63
F. — Hypothèses émises par différents auteurs pour expliquer le ralentissement puis l'arrêt de la multiplication microbienne.	64

III. — Comparaison, au cours de la multiplication microbienne, du nombre des microbes « visibles » au nombre des microbes « vivants » . . .	68
IV. — Remarques relatives aux travaux précédemment exposés. Buts que nous nous sommes proposés.	69

CHAPITRE III

ÉTUDE NUMÉRIQUE DE LA MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE LIQUIDES, ORDINAIRES OU SYNTHÉTIQUES

I. — Préparation des milieux de culture.	73
Principaux facteurs qui exercent une influence sur la composition et les propriétés des milieux de culture.. . . .	73
Eau peptonée simple.	75
Eau peptonée salée.	76
Première macération de viande.	76
Deuxième macération de viande.	76
Bouillon peptoné salé.	77
Bouillon à l'extrait de viande LIEBIG.	77
Bouillon MARTIN.. . . .	78
Milieu de AUBEL.. . . .	79
Milieu de LIOT.	79
Bouillon gélifié.	80
II. — Multiplication du bacille pyocyanique dans ces différents milieux de culture.	80
Mode opératoire utilisé.	80
Étude détaillée d'une multiplication microbienne.	82
Multiplication du bacille pyocyanique dans l'eau peptonée simple et dans l'eau peptonée salée.. . . .	87
Multiplication du bacille pyocyanique dans la première macération de viande.	97
Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon peptoné salé.	102
Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon à l'extrait de viande LIEBIG.	107
Multiplication du bacille pyocyanique dans le bouillon MARTIN.. . . .	112
Multiplication du bacille pyocyanique dans la seconde macération de viande.. . . .	115
Multiplication du bacille pyocyanique dans les milieux chimiquement définis.	119
III. — Comparaison des résultats obtenus.	125
1 ^o Les méthodes proposées donnent-elles de bons résultats dans l'étude numérique de la multiplication microbienne?	125
2 ^o Comparaison des résultats donnés par les deux méthodes de numération.	126
3 ^o Étude de la multiplication microbienne dans les différents milieux de culture.. . . .	129
4 ^o Variations dans la forme des bactéries au cours de la culture.	134
5 ^o Résumé et conclusion.	135

CHAPITRE IV

TENEUR EN MATIÈRES NUTRITIVES DES MILIEUX DE CULTURE LIQUIDES AVANT ET APRÈS LA MULTIPLICATION MICROBIENNE (FILTRATION SUR BOUGIE A LA 48^e HEURE DE LA CULTURE)

Généralités sur la nutrition des bactéries.	137
I. — Méthodes utilisées pour apprécier la valeur nutritive des milieux de culture.	138
1 ^o Mesures physiques: pH, déviation polarimétrique, tension superficielle.	139
2 ^o Composés azotés.	139

a) Azote total.	140
b) Azote amino-ammoniacal.	141
c) Azote ammoniacal.	142
d) Azote aminé.	143
e) Bases puriques et acide urique.	143
f) Créatine et créatinine.	143
g) Essai de précipitation fractionnée des protéides.	143
3° Carbone.	145
4° Phosphore.	150
5° Soufre.	153
6° Chlore.	155
II. — Composition des milieux de culture.	156
1° Influence de la coagulation des albumines sur la composition des macérations de viande.	156
2° Influence de la stérilisation à l'autoclave sur la composition des milieux.	157
3° Composition des milieux de culture.	158
4° Discussion des résultats.	161
III. — Modifications de la composition des milieux de culture sous l'influence de la multiplication microbienne.	163
1° La filtration sur bougie n'a pas d'influence sur la composition d'un milieu de culture.	163
2° Séparation des germes microbiens.	164
3° Comparaison entre la multiplication du bacille pyocyanique dans l'eau peptonée simple et dans l'eau peptonée salée.	165
4° Influence de la multiplication du bacille pyocyanique sur la composition des milieux de culture.	168
a) Changements apportés à la composition des milieux.	171
b) Constitution des bactéries.	174
c) Relation entre l'intensité de la multiplication microbienne et la composition du milieu nutritif.	176
d) Valeur nutritive des différents milieux utilisés.	178
CONCLUSIONS.	179
INDICATIONS BIBLIOGRAPHIQUES.	185

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

- 1° La croissance chez les levures ;
- 2° Nécessité du magnésium pour le développement des organismes.

Vu et approuvé :

Paris, le 18 février 1931,

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

MAURAIN

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

CHARLÉTY

